

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AMANDA LUIZ MACIEL**

**POTENCIAIS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS EM MODELOS  
ANIMAIS DE DEPRESSÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup>. João  
Luciano de Quevedo  
Coorientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislaíne  
Zilli Réus

**CRICIÚMA, JULHO DE 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M152p Maciel, Amanda Luiz.

Potenciais estratégias terapêuticas em modelos animais de depressão / Amanda Luiz Maciel. – 2017.

114 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientador: João Luciano de Quevedo.

Coorientador: Gislaine Zilli Réus.

1. Transtorno Depressivo Maior – Tratamento. 2. Antidepressivos. 3. Omega-3. 4. Ácido fólico. 5. Cetamina. 6. Minociclina. 7. Estresse oxidativo.

CDD. 23, ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Amanda Luiz Maciel** sob o título “**POTENCIAIS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS EM MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 12 de julho de 2017.

**Prof.ª Dra. ALEXANDRA ZUGNO**

Membro Relator – UNESC

**Prof. Dr. PAULO CÉSAR LOCK SILVEIRA**

Membro Interno – UNESC

**Prof.ª Dra. LISIANE TUON GENEROSO BITTENCOURT**

Membro Externo – UNESC

**Prof.ª Dra. MANUELLA PINTO KASTER**

Membro Externo – UFSC

**Prof.ª Dra. Josiane Budni**

Rep. do Orientador Dr. João Luciano de Quevedo

**Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa**

Coordenadora do PPGCS



## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

Os ensaios bioquímicos sobre o estresse oxidativo e nitrosativo foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL, Tubarão, SC e no Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.



*“Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida, minha mãe Marta Luiz Maciel por sempre acreditar e me apoiar, nos momentos bons e nos mais difíceis da jornada acadêmica e da vida; e a minha filha, Maria Heloísa Maciel Feijó por ser minha maior inspiração para seguir em frente e ser exemplo de dedicação à ciência e à realização dos sonhos; aos meus irmãos, cunhadas e meu pai Armando de Vargas Maciel (in Memoriam) por serem esta família que presente ou não, nunca me deixou desistir”.*





## AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a Deus, que me possibilitou coragem, força, saúde, serenidade e paciência para traçar esta longa caminhada, aos espíritos de Luz que me amparam, protegem e meu pai Armando de Vargas Maciel (*in Memoriam*) que me inspiraram a fé, o perdão, a paz, o amor que consola, me fazendo refletir que somos seres em reparação e evolução.

Agradeço a minha mãe Marta Luiz Maciel por sempre acreditar na minha capacidade e lutar junto comigo, me dando força para que eu chegasse até aqui, por ser minha melhor amiga, companheira, meu maior exemplo. Agradeço à minha filha, meu amor maior Maria Heloísa Maciel Feijó que desde muito pequena acompanha a mamãe nos estudos e já fala em ser “pesquisadora de ratinhos” igual a mãe, vocês são os maiores presentes de Deus na minha vida, me fortaleceram durante toda esta trajetória e mesmo com todos os percalços do caminho, afinal são longos quase quatro anos, não me deixaram desistir ou desanimar.

Agradeço aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhas (os) e toda a minha família, que sempre me apoiaram e foram solidários comigo na minha grande e árdua jornada, principalmente nos dois últimos anos que com a distância do RS a SC tudo ficou ainda mais cansativo.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. João Quevedo, por ter acreditado na minha capacidade e pela oportunidade que foi me dada desde o Mestrado de estudar em um laboratório de excelência, tenho imenso orgulho de contribuir com parte de suas pesquisas sabendo da importância e relevância de seu nome na ciência mundial.

Agradeço a minha coorientadora Professora Dra. Gislaïne Zilli Réus, pelo carinho, amizade, serenidade em coordenar o grupo de depressão, de forma que todos os integrantes possam partilhar de novos conhecimentos e oportunidades, incentivando sempre que tudo pode ser possível mediante um trabalho ético, eficaz e de qualidade, és uma grande pesquisadora, excelente exemplo a teus alunos. Agradeço também por ter acreditado no meu trabalho e pelo companheirismo em todos os momentos, pela segurança de que tudo daria certo, pela amizade sincera, por ter contribuído para meu crescimento científico e pessoal.

Agradeço imensamente a Helena Mendes Abelaira, minha companheira de estudos, na organização e condução dos experimentos na bancada e em todas as situações do doutorado, nas quais sempre se colocou à disposição para me ajudar no que fosse necessário. Uma amiga que descobri junto da ciência e que tive o privilégio de



compartilhar de grandes momentos de afeto, carinho, parcerias, longas conversas, de muita cumplicidade nos estudos e na vida pessoal.

Agradeço a Maria Augusta Bernardini dos Santos, Zuleide Maria Ignácio, Ritele Hernandez da Silva, Anelise Scussel Carlessi, Thayse Rosa minhas companheiras de mestrado e doutorado, pelo aprendizado prático e científico, pela amizade, pelas trocas de grandes ideias sobre a ciência e a vida.

Agradeço à Amanda Valnier Steckert, pelo carinho, amizade, aprendizado compartilhado, viagens e pelos bons momentos de descontração no laboratório.

Agradeço aos alunos de iniciação científica, Airam Barbosa de Moura, Danyela Matos, Ana Caroline Darabas, Murilo Parzianello, Thays Guimarães de Souza, Thais Ruschel dos Santos, que sempre se colocaram a disposição e continuam contribuindo para que tenhamos um maravilhoso grupo de pesquisa, vocês são parte fundamental em todo processo.

Agradeço a todos os professores e colegas das demais equipes do NEUROLAB, pois juntos formamos uma grande equipe entusiasmada pelas neurociências e reconhecida nacionalmente e mundialmente a qual tenho muito orgulho de participar.

Agradeço em especial as professoras do PPGCS que foram grandes exemplos para mim, as quais tenho imensa satisfação de se fazerem presentes em minha banca examinadora professoras Alexandra Zugno e Josiane Budni pelo carinho, incentivo nos momentos difíceis, por serem profissionais acessíveis e exemplo de grandes mulheres na ciência.

Agradeço a coordenadora do curso de enfermagem da UNICNEC – Osório - RS, Professora Jandrice Carrasco e as minhas colegas professoras que me incentivaram muito para que eu pudesse alcançar o tão almejado título de doutora, se orgulhando junto a mim de cada passo.

Agradeço a minha coordenadora do CAPS – Tramandaí Sabrina Segatti e aos meus colegas de trabalho, pelas pesquisas compartilhadas, compreensão nos momentos de longas jornadas de estudo, e trocas de escala entendendo a necessidade do foco principalmente no que compreende este momento final de conclusão da tese.

Por fim, agradeço a cada paciente que desde o início da minha trajetória nas ciências da saúde no meu curso técnico de enfermagem há aproximadamente 12 anos me fizeram ficar intrigada com a mente humana, me fizeram querer estar mais perto do cuidado a saúde mental,



compreendendo mais profundamente o que pode ser visto e feito para o alívio dos sofrimentos psíquicos.

Minha profunda gratidão!!!



“...Sirvam nossas façanhas  
de modelo a toda terra...”

Hino Riograndense





## RESUMO

Modelos animais são importantes ferramentas para a investigação da fisiopatologia, de transtornos psiquiátricos, tais com o transtorno depressivo maior (TDM), assim como estudar os efeitos de fármacos antidepressivos. Embora a fisiopatologia do TDM ainda não esteja esclarecida o estresse oxidativo é apontado com um importante fator. Cerca de 50% dos pacientes com TDM não melhoram com os antidepressivos disponíveis. Assim, é importante a investigação de novas estratégias terapêuticas. Deste modo, este estudo teve como objetivo investigar novas estratégias com potencial antidepressivo usando o ômega-3, o ácido fólico, a N-acetilcisteína (NAC), a cetamina e a minociclina para prevenir ou reverter alterações comportamentais e cerebrais induzidas pelo estresse no início da vida ou tardio. Para induzir o estresse no início da vida ratos Wistar foram privados dos cuidados maternos durante os 10 primeiros dias de vida. Para induzir o estresse tardio ratos Wistar foram submetidos ao modelo de estresse crônico moderado (ECM) por 40 dias. Para prevenir os efeitos do estresse o tratamento foi feito via oral por 20 dias com ômega-3 (0,72 g/kg), ácido fólico (50 mg/kg) e NAC (20 mg/kg). Para reverter os efeitos do estresse o tratamento foi feito via intraperitoneal com uma única dose de cetamina (15 mg/kg), e por 15 dias com minociclina (25 mg/kg) e amitriptilina (10 mg/kg). Após foi realizado o teste do nado forçado e analisado parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo, amígdala e núcleo accumbens. O tratamento com cetamina, minociclina, amitriptilina, ômega-3 e ácido fólico foram capazes de exercer efeitos antidepressivos no teste do nado forçado. Porém, esses efeitos antidepressivos foram dependentes do modelo de estresse pelos quais os animais foram expostos. Em determinadas regiões cerebrais algumas estratégias de tratamento apresentaram um efeito pró-oxidante. Porém, a maioria das estratégias usadas nesse estudo exerceram efeitos antioxidantes, como relatado pela diminuição do dano em proteínas, lipídeos, concentração de nitrito/nitrato e da atividade da mieloperoxidase (MPO). Além disso, um aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) também foram evidentes após o tratamento com estratégias de prevenção e reversão. Em conclusão, os efeitos antidepressivos da cetamina, minociclina, ômega-3 e ácido fólico no presente estudo podem ser associados, pelo menos em parte, aos seus



efeitos antioxidantes e neuroprotetores em animais submetidos ao estresse no início da vida ou tardio.

**Palavras-chave:** ômega-3, ácido fólico, cetamina, minociclina, estresse oxidativo, transtorno depressivo maior.



## ABSTRACT

Animal models are important tools for investigating the pathophysiology of psychiatric disorders such as major depressive disorder (MDD), as well as studying the effects of antidepressant drugs. Although the pathophysiology of MDD is still unclear, oxidative stress is pointed out with an important factor. About 50% of MDD patients do not improve with the available antidepressants. Thus, it is important to investigate new therapeutic strategies. Thus, this study aimed to investigate new strategies with antidepressant potential using omega-3, folic acid, N-acetylcysteine (NAC), ketamine and minocycline to prevent or reverse behavioral and brain changes induced by stress at the early or late life. To induce early life stress, Wistar rats were deprived of maternal care during the first 10 days of life. To induce late life stress, Wistar rats were submitted to the chronic mild stress (CMS) for 40 days. To prevent the effects of stress, the treatment was done orally for 20 days with omega-3 (0.72 g/kg), folic acid (50 mg/kg) and NAC (20 mg/kg). To reverse the effects of stress, treatment was done intraperitoneally with a single dose of ketamine (15 mg/kg), and for 15 days with minocycline (25 mg/kg) and amitriptyline (10 mg/kg). After treatment, the animals were submitted to the forced swimming test and were analyzed the oxidative stress parameters in the prefrontal cortex (CPF), hippocampus, amygdala and nucleus accumbens. Treatment with ketamine, minocycline, amitriptyline, omega-3 and folic acid were able to exert antidepressant effects in the forced swimming test. However, these antidepressant effects were dependent on the stress model by which the animals were exposed. In certain brain regions some treatment strategies had a pro-oxidant effect. However, most of the strategies used in this study had antioxidant effects, as reported by decreased on protein and lipid damage, nitrite/nitrate concentration and myeloperoxidase (MPO) activity. In addition, an increased activity of antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes were also evident after prevention and reversal treatment strategies. In conclusion, the antidepressant effects of ketamine, minocycline, omega-3 and folic acid, in the present study, may be associated, at least in part, with its antioxidant and neuroprotective effects in animals subjected to stress in early or late life.

**Keywords:** Omega-3, folic acid, ketamine, minocycline, oxidative stress, major depressive disorder



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Efeitos do tratamento de prevenção depois do protocolo de PM. O protocolo de PM foi realizado durante 10 dias após o primeiro dia pós-natal. Ratos machos adolescentes foram tratados com salina ou ômega -3 (0.72 g/kg) ou N-acetilcisteína (20 mg/kg) ou ácido fólico (50 mg/kg) durante 20 dias, até a fase adulta. Os testes do campo aberto e treino do nado forçado foram realizados no 60° dia e o teste do nado forçado foi realizado no 61° dia 1h após a última administração do tratamento..... 52
- Figura 2 - Efeitos do tratamento de prevenção após o protocolo de ECM. O protocolo de ECM foi realizado durante 40 dias. Ratos machos adultos foram tratados com ômega-3 (0.72 g/kg) ou N-acetilcisteína (20 mg/kg) ou ácido fólico (50 mg/kg) durante 20 dias. Os testes do campo aberto e treino do nado forçado foram realizados no 41° dia e o teste do nado no 42° dia, 1 h após a última administração do tratamento. .... 52
- Figura 3 - Efeitos do tratamento de reversão após o protocolo de PM. O protocolo de PM foi realizado durante 10 dias após o primeiro dia pós-natal. Ratos machos adultos foram tratados com cetamina (15 mg/kg) ou minociclina (25 mg/kg) ou amitriptilina (10 mg/kg) ou salina. Os testes do campo aberto e treino do nado forçado foram realizados no 67° dia e o teste do nado forçado no 68° dia, oito dias após uma injeção única de cetamina. Ratos tratados com minociclina ou amitriptilina foram submetidos ao teste do campo aberto e treino do nado forçado no 74° dia e o teste do nado forçado foi realizado no 75° dia 1 h após a última administração do fármaco. O tratamento com minociclina ou amitriptilina começou no 60° dia e terminou no 75° dia. .... 53
- Figura 4 - Efeitos do tratamento de reversão após o protocolo de ECM. O protocolo de ECM foi realizado durante 40 dias. Ratos machos adultos foram tratados com cetamina (15 mg/kg) ou minociclina (25 mg/kg) ou amitriptilina (10 mg/kg). Os testes do campo aberto e treino do nado forçado foram realizados no 47° dia e o teste do nado forçado foi realizado no 48° dia, oito dias após uma única injeção de cetamina. Ratos tratados com minociclina ou amitriptilina foram submetidos ao teste do campo aberto e treino do nado forçado no 53° dia e o teste do nado forçado foi realizado no 54° dia, 1 h após a última administração do medicamento. O tratamento com minociclina ou amitriptilina começou no 41° dia e terminou no 54° dia. .... 54
- Figura 5A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle +





salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	60
Figura 5B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do campo aberto em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	60
Figura 6A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	62
Figura 6B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis de carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	63
Figura 6C - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	64
Figura 6D - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	65
Figura 7A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	66
Figura 7B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	67



Figura 8A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	68
Figura 8B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do campo aberto em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM.....	68
Figura 9A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	69
Figura 9B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	70
Figura 9C - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	71
Figura 9D - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	72
Figura 10A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	74
Figura 10 - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam	



média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	75
Figura 11A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	76
Figura 11B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico no teste do campo aberto em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. ....	76
Figura 12A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	78
Figura 12B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	79
Figura 12C - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	80
Figura 12D - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.....	81
Figura 13A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	82
Figura 13B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos	



submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	83
Figura 14A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	84
Figura 14B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico no teste do campo aberto em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. ....	84
Figura 15A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	85
Figura 15B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	86
Figura 15C - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	87
Figura 5D - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	88
Figura 16A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. * <i>p</i> <0,05 vs. controle + salina; # <i>p</i> <0,05 vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. ....	89
Figura 16B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos	





submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM.  
\* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. .... 90



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>39</b>
1.1 DEPRESSÃO .....	39
1.2 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO PARA O TRATAMENTO DO TDM.....	41
1.3 ESTRATÉGIAS DE REVERSÃO PARA O TRATAMENTO DO TDM.....	43
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E TDM .....	45
1.5 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO .....	46
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>49</b>
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>50</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	50
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	50
3.3 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO MATERNA.....	50
3.4 PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO.....	50
3.5 TRATAMENTO DE PREVENÇÃO .....	51
3.6 TRATAMENTO DE REVERSÃO .....	52
3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	54
<b>3.7.1 Teste do campo aberto</b> .....	<b>54</b>
<b>3.7.2 TESTE DO NADO FORÇADO</b> .....	<b>54</b>
3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	55
<b>3.8.1 Preparação do tecido e homogenado</b> .....	<b>55</b>
<b>3.8.2 Procedimentos de análise de estresse oxidativo</b> .....	<b>55</b>
<b>3.8.3 Procedimentos de análise de estresse nitrosativo</b> .....	<b>57</b>
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
4.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM.....	59
4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM.....	61
4.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM.....	65



4.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM.....	67
4.5 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM.....	69
4.6 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM .....	73
4.7 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM.....	75
4.8 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM.....	77
4.9 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM.....	81
4.10 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM.....	83
4.11 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM.....	85
4.12 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM .....	88
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>114</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO

A história do conceito de depressão, tal como a concebemos na atualidade tem seu início no século XVII. O desenvolvimento do conceito depressão, também conhecido como Transtorno Depressivo Maior (TDM) foi bem elucidado com o declínio das crenças mágicas e supersticionismo que fundamentava o entendimento dos transtornos mentais naquela época. Entretanto, sua origem pode ser inferida a partir das menções de alterações de humor ao longo da história, sobretudo nas referências ao estado conhecido como melancolia historicamente estudada (Rosseau, 2000).

O TDM é um transtorno grave que tem enormes consequências para a qualidade de vida das pessoas e é uma das formas mais prevalentes de doença mental (Larsen et al., 2010). Além disso, pacientes que sofrem de depressão severa apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, com consequências econômicas e sociais profundas (Nemeroff e Owens, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o TDM ocupava em 2004 o primeiro lugar no ranque das principais doenças que mais causam incapacitação não fatal, o terceiro lugar em carga global de incapacidade e a estimativa é que ocupará o primeiro lugar em 2030, entre as doenças com maior carga global (WHO, 2008).

Além dos sérios prejuízos aos quais o paciente é submetido durante o estado depressivo, é importante destacar que o TDM é uma doença crônica e recorrente (Keller et al., 1992; Mueller et al., 1999), fato que predispõe o ser humano a uma condição de constante preocupação e expectativas ruins. É importante também enfatizar que o TDM é altamente predisponente ao suicídio (Cuijpers e Smit, 2002). Vários estudos mostram que o TDM tem um componente familiar altamente prevalente (Marazita et al., 1997; Holmans et al., 2007), com a herdabilidade transcorrendo em várias gerações e os indicativos aparecendo bem cedo na vida das pessoas, em grande parte na adolescência (Weissman et al., 2005; Weissman et al., 2006).

O TDM, segundo os critérios diagnósticos do episódio depressivo maior pelo DSM-5 (APA, 2014), caracteriza-se por episódios recorrentes de humor deprimido, juntamente com aumento do isolamento social (diminuição do interesse ou da sensação de prazer, sentimentos de menos-valia) e sintomas somáticos característicos (diminuição da energia, alterações do apetite e do sono, dor muscular e

redução dos movimentos com latência da fala) (Vismari et al., 2008). Porém, estes sintomas devem persistir por duas semanas ou mais e interferir significativamente nas atividades diárias do paciente, como trabalho e relacionamentos pessoais (Duman et al., 1998).

O TDM pode ocorrer como um transtorno isolado ou pode ser precipitado por outras doenças, como acidente vascular cerebral, demência, diabetes, câncer e coronariopatia, entre outros, embora exista certa predisposição genética ao TDM (Karg et al., 2011; Menke et al., 2012). Acredita-se que fatores estressantes, que levam a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e toxicidade por liberação excessiva de glicocorticóides, possam desencadear o TDM na ausência da vulnerabilidade genética (Nemeroff e Owens, 2002).

Estudos sobre a fisiopatologia do TDM revelam que há uma redução no sistema de neurotransmissores monoaminérgicos que incluem: serotonina, dopamina e noradrenalina (Manji et al., 2001), além de perda de células neuronais e danos na via de sinalização que controlam a neuroplasticidade e sobrevivência celular (Manji et al., 2001, Drzyzga et al., 2009). Ainda, a recorrência ou persistência do transtorno e a falta de tratamento com antidepressivos podem favorecer a diminuição gradual do volume hipocampal, que por sua vez, pode explicar os problemas de memória de alguns pacientes e vários outros sintomas do transtorno (Aan Het Rot et al., 2009; McDermott e Ebmeier de 2009).

Vários fármacos com propriedades antidepressivas para o tratamento do TDM encontram-se no mercado, estes podem ser considerados seguros e efetivos, tais como, os tricíclicos, os inibidores da enzima monoamina oxidase (iMAO), os inibidores seletivos da recaptação de monoaminas e mais recentemente os antidepressivos triplos (Berton e Nestler, 2006; Nemeroff, 2006; Chen e Skolnick, 2007). Contudo, a resposta aos antidepressivos não é imediata e costuma ocorrer entre a segunda e a quarta semana de uso (Anderson et al., 2000). Além disso, os antidepressivos somente proporcionam uma remissão completa da sintomatologia em cerca de 50% dos indivíduos com TDM (Nestler et al., 2002), além de causarem efeitos colaterais, tais como ganho de peso e sedação (Brunello et al., 2002; Stahl e Grady, 2003).

Considerando o longo tempo de latência para o efeito terapêutico, os efeitos colaterais e o fato de um número significativo de pacientes não responderem aos tratamentos com os antidepressivos atuais, as pesquisas devem estar focadas em novos mecanismos de ação, com efeitos mais rápidos e menos adversos, que sejam mais seguros e



eficientes para o tratamento do TDM (Berton e Nestler, 2006). Muitos estudos relatam novas teorias sobre a fisiopatologia do TDM e possíveis mecanismos de ações dos antidepressivos, considerando os processos neurobiológicos, estresse oxidativo, à plasticidade neuronal e sináptica, e os fatores convergentes entre todas as evidências (Sanacora et al., 2008; Zarate e Manji, 2008).

## 1.2 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO PARA O TRATAMENTO DO TDM

Diversas alternativas não farmacológicas têm sido utilizadas para prevenir ou auxiliar no tratamento do TDM por existir a necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica. Neste contexto, evidências demonstram que o ácido fólico, uma vitamina do complexo B que age no metabolismo, possa contribuir para a prevenção do TDM (Coppen e Bolander-Gouaille, 2005; Morris et al., 2009) O ácido fólico é uma coenzima na biossíntese de nucleotídeos e da tetrahydrobiopterina, a qual é uma coenzima para a hidroxilação de fenilalanina e triptofano na biossíntese de dopamina, noradrenalina e serotonina (Coppen et al., 1989). Além disso o ácido fólico, através da promoção do reparo e crescimento neuronal, exercendo assim, um possível papel neuroprotetor em danos ao sistema nervoso central (SNC) (Iskandar et al., 2004). Estudos clínicos demonstram que pacientes com TDM apresentam baixas concentrações plasmáticas e eritrocitárias de ácido fólico e que este fato pode estar associado a uma pobre resposta ao tratamento com antidepressivos (Fava et al., 1997; Alpert et al., 2000). Além disso, vários estudos relatam que a suplementação com ácido fólico em pacientes deprimidos pode melhorar o efeito terapêutico de antidepressivos, como por exemplo, a fluoxetina (Coppen e Bailey, 2000; Abou-Saleh e Coppen, 2006) uma vez que pacientes com depressão possam apresentar uma deficiência funcional de folato (Reynolds, 2002; Coppen e Bolander-Gouaille, 2005); e que a severidade desta deficiência, indicada pelos elevados níveis de homocisteína, é correlacionada com a severidade do TDM (Tiemeier et al., 2002).

Evidências demonstram que a utilização de nutrientes que apresentam efeitos similares aos fármacos da classe dos antiinflamatórios não esteróides (AINH), como os ácidos graxos ômega-3 promovem a prevenção e o tratamento de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, infecções, lesões,

alterações imunológicas e de transtornos do humor (Andrade et al., 2006). Os ácidos graxos poli-insaturados, grupo ao qual pertence o ômega-3, atuam na sinalização celular, regulação enzimática, síntese de eicosanóides, regulação da migração neuronal, determinação da plasticidade sináptica e modulação de citocinas que possuem atividade neuromodulatória e neurotransmissora (Zemdegs et al., 2010). Neste contexto, a associação entre o consumo de ômega-3 e a presença de sintomas depressivos e ansiosos está sendo investigada, e há relatos que sociedades com alto consumo de ômega-3 apresentam menor prevalência de depressão (Cortes et al., 2013). Constatou-se ainda que os pacientes com TDM possuem menores níveis corpóreos de ômega-3 e que há correlação negativa significativa entre esses níveis e a gravidade dos sintomas depressivos (Su, 2009). Além disso, um estudo mostrou que adolescentes com transtornos alimentares e sintomas depressivos possuíam níveis de ômega-3 significativamente menores quando comparado com adolescentes com transtornos alimentares, porém sem os sintomas depressivos (Swenne et al., 2011). Dessa forma, tanto pelas suas ações diretas em estruturas cerebrais quanto pela sua característica anti-inflamatória, a suplementação com ômega-3 pode vir a ser uma estratégia benéfica para prevenir e/ou melhorar os sintomas depressivos.

A estratégia antioxidante, através da inibição da formação ou ação de radicais livres, tem sido foco de atenção devido ao seu alto potencial de controlar doenças neurodegenerativas (Banaclocha, 2001). A N-acetilcisteína (NAC), um tiol-composto, tem sido usada terapêuticamente devido à sua propriedade de ser um precursor da glutatona (De Flora et al, 1991), possuindo, portanto, um papel-chave na homeostase celular, visto que a depleção de glutatona pode causar morte celular devido à peroxidação lipídica e declínio nos níveis de proteínas tiol (Reed e Farriss, 1984). A NAC também pode atuar diretamente reduzindo os níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROs) *in vivo* e *in vitro* (Aruoma et al., 1989); e ainda há evidências sugerindo que a NAC pode ter um papel na sobrevivência neuronal através de outros mecanismos não-relacionados com suas propriedades antioxidantes, inibindo assim a apoptose celular (Ferrari et al., 1995, Xiong et al., 1999). Dessa forma, estudos demonstram efeitos positivos da NAC quando adicionada ao tratamento antidepressivo em pacientes com depressão (Berk et al, 2008, 2011; Magalhães et al, 2011), além da boa tolerabilidade e ausência de efeitos colaterais significativos (Whyte et al., 2007). Além disso, a NAC apresentou efeitos antidepressivos em alguns modelos pré-clínicos de depressão, tais como o teste do nado

forçado (Ferreira et al., 2008) e o teste de suspensão da cauda (Linck et al., 2012). A NAC foi também capaz de reverter a diminuição do consumo de sacarose (interpretada como sintoma de anedonia) em ratos submetidos a um protocolo de estresse (Arent et al., 2012); sugerindo que estes resultados podem estar relacionados com a redução do estresse oxidativo (Ferreira et al., 2008; Arent et al., 2012; Smaga et al., 2012).

### 1.3 ESTRATÉGIAS DE REVERSÃO PARA O TRATAMENTO DO TDM

Cerca de 30% a 40% dos pacientes com TDM não respondem a qualquer tipo de tratamento existente e os efeitos antidepressivos geralmente são tardios, com um período de resposta que leva de 4 a 8 semanas (Trivedi et al., 2006). Maes e colaboradores (1995) demonstraram que o TDM é acompanhado por ativação da resposta inflamatória. De fato, a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias podem desencadear a fisiopatologia do TDM (Owen et al., 2001; Tuglu et al., 2003). Outro fator estudado é a diminuição da sobrevivência neuronal, neuroplasticidade e neurogênese no hipocampo que podem ser potenciais fatores para o desenvolvimento desse transtorno do humor (Czeh e Lucassen, 2007; Perera et al., 2007). Neste contexto, um novo tratamento para a depressão vem sendo estudado, por possuir um mecanismo de ação diferente dos antidepressivos atuais, a minociclina. A minociclina é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração, com uma molécula altamente lipofílica, capaz de penetrar na barreira hematoencefálica (Pae et al., 2008). Consiste num antibiótico efetivo contra infecções de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Seus mecanismos de ação em relação à atividade antimicrobiana são baseados nas características das tetraciclinas que inibem a síntese proteica das bactérias (Domercq e Matute, 2004; Kim e Suh, 2009). O mecanismo de ação da minociclina é exercido através da inibição do citocromo c a partir de sua liberação da mitocôndria, inibição da expressão da caspase e supressão da ativação microglial (Kim e Suh, 2009). Desse modo, a minociclina reduz a transcrição da síntese de óxido nítrico, ciclo-oxigenase-2 e da subsequente liberação de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2, exercendo assim efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios (Pae et al., 2008; Hashimoto, 2009).

Estudos mostraram que a minociclina exerce efeitos neuroprotetores na esclerose lateral amiotrófica e na doença de Parkinson (Investigators, 2006; Traynor et al., 2006). Além disso,

evidências apontam a minociclina como um novo potencial agente para o tratamento do TDM (Pae et al., 2008; Hashimoto, 2009). Levine e colaboradores (1996) mostraram que a minociclina exerceu efeitos antidepressivos em pacientes com depressão bipolar. Além disso, em animais, um estudo mostrou que a minociclina foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade e aumentar o tempo de escalada no teste do nado forçado em ratos (Molina-Hernandez et al., 2008). O' Connor e colaboradores (2009) observaram que a minociclina atenuou o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS), prevenindo assim, o desenvolvimento do comportamento depressivo em ratos. Baseado nestes achados de modelos animais e estudos em humanos sugerem-se que a minociclina pode ser um novo agente antidepressivo, através da sua atividade anti-inflamatória e neuroprotetora.

Um outro fármaco que vem sendo utilizado é a Cetamina, em doses sub-anestésicas, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), inicialmente utilizado como anestésico geral intravenoso, é capaz também de reduzir sintomas depressivos em pacientes diagnosticados com TDM (Berton e Nestler, 2006). Além disso, ações rápidas da cetamina têm sido observadas em pacientes que são resistentes a tratamentos com dois ou mais antidepressivos clássicos (Zarate et al., 2006). Ainda, estudos prévios mostraram que a cetamina apresenta efeitos antidepressivos em ratos submetidos ao estresse, incluindo a privação materna e o estresse crônico moderado (Garcia et al., 2008a, 2008b, 2009; Réus et al., 2013a, 2013b). Também, Réus e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento combinado de cetamina e imipramina (um antidepressivo tricíclico) produziu um aumento nos níveis da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) e no fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala, aumentou a fosforilação da proteína quinase A (PKA) no hipocampo e amígdala e ainda, aumentou a fosforilação da proteína quinase C (PKC) no córtex pré-frontal, sugerindo que a co-administração destes fármacos pode induzir uma atividade antidepressiva mais efetiva comparado com o tratamento com cada um destes fármacos sozinhos. A cetamina estimula a sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) no córtex pré-frontal e o tratamento agudo com cetamina aumenta os níveis de BDNF no hipocampo (Garcia et al., 2008a, 2008b; Hoeffler e Klann, 2010; Li et al., 2010; Li et al., 2011). Por outro lado, a infusão de rapamicina, um inibidor da via mTOR, bloqueia os efeitos antidepressivos da cetamina (Li et al., 2010; Abelaira et al., 2017).

No entanto, ainda não estão totalmente elucidados como ocorrem os efeitos antidepressivos e mecanismos moleculares exercidos pela cetamina e pela minociclina, por isso é de extrema importância mais estudos que investiguem esses efeitos associados com vias envolvidas com a fisiopatologia da depressão.

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E TDM

Evidências indicam que a exposição ao estresse oxidativo pode induzir a diversas patologias psiquiátricas, incluindo o TDM, sugerindo uma possível relação deste transtorno com processos neurodegenerativos em diferentes áreas do cérebro. As EROs podem desencadear a fisiopatologia do TDM (de Kloet et al., 2005). Alterações na biologia oxidativa, estão sendo reconhecidas amplamente como rota crítica do dano que envolve a fisiopatologia das doenças psiquiátricas induzidas pelo estresse (Berk, 2007). O processo de estresse oxidativo origina-se de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo, leva à oxidação de biomoléculas com consequente supressão de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell e Whiteman, 2004). Em condições fisiológicas, o resultado da respiração celular leva a produção de radicais livres, tais como as EROs e as espécies reativas ao nitrogênio (ERNs), que são contrabalanceadas por vias de defesa antioxidante (Maes et al., 2011). Porém, a contínua produção de EROs podem causar danos celulares por inativação enzimática, peroxidação lipídica e modificação do DNA (Floyd, 1999) e como consequência, levar a necrose ou apoptose celular dependendo da severidade do dano oxidativo (Finkel e Holbrook, 2000), além de permeabilidade da membrana mitocondrial, o que levaria a uma disfunção mitocondrial. O aumento do estresse oxidativo ou das disfunções mitocondriais podem levar também a um aumento da inflamação no SNC e na periferia. De fato, um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL -1, IL-6, IL-8, IL-12, o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) já foram observados em pacientes com depressão (Schiepers et al., 2005; Raison et al., 2006; Mossner et al., 2007). As citocinas que são produzidas na periferia chegam ao cérebro através da ligação das citocinas a moléculas específicas expressas no endotélio do cérebro e outros fatores, que levam as citocinas a afetarem as funções cerebrais (Raison et al, 2006., Khairova et al., 2009), que

pode ser associada com a depressão. As citocinas também liberam as vesículas de glutamato dos astrócitos, levando a uma ativação dos receptores NMDA pré-sinápticos (Santello e Volterra, 2012) e estimulam a indolamina dioxigenase 2,3 (IDO), que é um potente agonista do receptor NMDA e estimulador da liberação de glutamato (Miller et al., 2009), dessa forma, ambos contribuindo para excitotoxicidade glutamatérgica. Em animais, Lucca e colaboradores (2009a) demonstraram um aumento na produção de superóxido em hipocampo e córtex pré-frontal e um aumento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex de ratos submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado. Por outro lado, Abelaira e colaboradores (2013) demonstraram que a administração crônica de lamotrigina (um anticonvulsivante) aumentou a atividade da superóxido dismutase e da catalase em córtex pré-frontal de ratos submetidos ao estresse crônico moderado. A administração aguda e crônica de harmina (uma  $\beta$ -carbonila) e imipramina (um antidepressivo tricíclico) promovem efeitos antioxidantes em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos (Réus et al., 2010).

Evidências indicam que a susceptibilidade ao TDM aumenta em relação a níveis elevados de estresse oxidativo ou a um desequilíbrio na atividade antioxidante, ou ainda por alterações mitocondriais e ativação do sistema imune. Além disso, os efeitos antidepressivos das terapias preventivas ou reversíveis podem ser mediados, pelo menos em parte, pelos seus efeitos na regulação destes sistemas. No entanto, como esses efeitos podem ocorrer ainda não está bem definido.

## 1.5 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

Os modelos animais são ferramentas essenciais de pesquisa para investigar a etiologia, os mecanismos moleculares subjacentes a uma doença e avaliar a potencial eficácia de intervenções terapêuticas, pois refletem as características da doença no homem, simulam as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença e seus distúrbios funcionais (Pollak et al., 2010). Os modelos experimentais foram desenvolvidos para avaliar as consequências de experiências adversas na neurobiologia e no comportamento, e este modelo tem sido descrito como um modelo de vulnerabilidade a dependência de drogas, a doenças induzidas pelo estresse e depressão. Apesar de algumas limitações como, não poder observar nos animais sentimentos de tristeza, culpa ou pensamentos suicidas, onde são sintomas limitados principalmente para os seres humanos, nesta linha de pesquisa, os modelos animais de

transtornos psiquiátricos têm sido descritos como importantes ferramentas para investigar a neurobiologia da depressão e disfunções relacionadas, bem como auxiliado no progresso do desenvolvimento de alvos terapêuticos eficazes para o seu tratamento (Abelaira et al., 2013).

Se o modelo animal for capaz de reproduzir, mesmo que em escala reduzida alguns aspectos centrais do transtorno psiquiátrico tornam-se uma ferramenta valiosa na análise da multiplicidade de causas, fatores genéticos, ambientais ou farmacológicos (Pollak et al., 2010). Além disso, se apresentarem sintomas similares aos dos pacientes com transtornos mentais, permitem o estudo dos mecanismos de comportamentos específicos, da sua fisiopatologia e auxiliam no desenvolvimento e predição de respostas terapêuticas para os agentes farmacológicos. Apesar dos desafios no uso de um modelo animal, progressos vêm sendo feitos para o desenvolvimento e otimização de novos modelos de comportamento para a maioria das doenças do SNC e estes modelos tem proporcionado informações valiosas sobre o mecanismo e tratamento de doenças (McGonigle, 2014). Dentre os modelos animais mais utilizados estão descritos o protocolo de privação materna e o de estresse crônico moderado, ambos utilizados nesta pesquisa, incluindo a verificação dos efeitos de novos alvos terapêuticos para o tratamento da depressão nos diferentes processos destes protocolos.

O protocolo de privação materna (PM) é usado para estudar os eventos adversos precoces na vida, sendo que estudos reforçam que o ambiente neonatal precoce tem profundo impacto no desenvolvimento do SNC dos mamíferos. Os estímulos interagem com o modelo genético na formação de fenótipos individuais e sua subsequente percepção. O aumento da evidência básica, clínica e epidemiológica apoia a ideia de que a exposição a um ambiente pode estar diretamente ligada à vulnerabilidade e, mais tarde, à expressão de doenças, incluindo diferentes distúrbios psiquiátricos (Ignácio et al., 2017).

A PM em ratos filhotes mimetiza a perda ou negligência dos pais em seres humanos que tem sido apresentada como um dos fatores de estresse natural mais potente durante o desenvolvimento. A PM foi desenvolvida para avaliar as consequências de experiências adversas na neurobiologia e no comportamento, e este modelo tem sido descrito como um modelo de vulnerabilidade a dependência de drogas, a doenças induzidas pelo estresse e depressão. Além disso, o modelo de PM é um importante modelo para investigação da fisiopatologia e tratamento da depressão (Anisman et al., 1997; Abelaira et al., 2013).

Estudos demonstram que a privação dos cuidados maternos durante os dez primeiros dias de vida em roedores, induz um comportamento do tipo depressivo na vida adulta da prole, acompanhado também de uma diminuição de neurotrofinas, as quais são importantes na plasticidade celular no cérebro, e um aumento de citocinas pró-inflamatórias na periferia (Réus et al., 2011; Réus et al., 2013). Por outro lado, o tratamento com antidepressivos em animais privados do cuidado materno foi capaz de reverter o comportamento depressivo, promover um aumento nos níveis de neurotrofinas e neurogênese, e diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Nestler et al., 2010; Réus et al., 2011, 2013).

Outro modelo bastante utilizado para pesquisas da depressão é o protocolo estresse crônico moderado (ECM), o que leva os animais a produzirem diferentes sintomas de depressão, tais como, anedonia, alterações no sono, diminuição dos comportamentos sexuais e agressivos, bem como, diminuição da atividade locomotora. Neste caso, se apresentam sintomas similares aos dos pacientes com transtornos mentais, permitindo o estudo dos mecanismos de comportamentos específicos, da sua fisiopatologia e auxiliando no desenvolvimento e predição de respostas terapêuticas para os agentes farmacológicos. De acordo com estas características, muitas pesquisas utilizam o modelo animal de ECM para estudar a neurobiologia da depressão, bem como para elucidar novos alvos terapêuticos para o tratamento (Willner, 1997; Abelaira et al., 2013). Os animais expostos a este tipo de protocolo ainda exibem alterações de parâmetros moleculares, que estão relacionados à validade de constructo deste modelo animal, já foram observadas alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que são também encontradas em pacientes deprimidos. (Fortunato et al., 2010) Animais submetidos a um protocolo de estresse exibem aumento nos níveis de cortisol e no peso da glândula adrenal, alterações em lipídeos e proteínas, diminuição na atividade de enzimas antioxidantes e também aumento de citocinas pró-inflamatórias (Lucca et al., 2009b).

Embora exista uma associação entre estresse oxidativo e o TDM esta relação em diferentes modelos de estresse ainda não foi totalmente elucidada. Assim, este estudo foi desenvolvido para melhor compreender os efeitos induzidos pelo estresse no início da vida ou tardiamente em parâmetros de estresse oxidativo em diferentes regiões cerebrais. Além disso, foram investigados os efeitos de diferentes estratégias terapêuticas utilizando fármacos de ação rápida com o intuito de prevenir ou reverter as alterações induzidos pelo estresse.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento de prevenção e reversão sob o comportamento e parâmetros de estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a modelos animais de depressão.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar os efeitos do tratamento de prevenção com ômega-3, NAC e ácido fólico sob o comportamento do tipo depressivo através do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em ratos submetidos aos modelos animais de ECM e PM;
- b) Investigar os efeitos do tratamento de reversão com cetamina, minociclina e amitriptilina sob comportamento do tipo depressivo através do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em ratos submetidos aos modelos animais de ECM e PM;
- c) Investigar os efeitos do tratamento de prevenção com ômega-3, NAC e ácido fólico sob os níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, atividade da enzima mieloperoxidase e concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos aos modelos animais de ECM e PM;
- d) Investigar os efeitos do tratamento de reversão com cetamina, minociclina e amitriptilina sob os níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, atividade da enzima mieloperoxidase e concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos aos modelos animais de ECM e PM;
- e) Investigar os efeitos do tratamento de prevenção com ômega-3, NAC e ácido fólico sob a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos aos modelos animais de ECM e PM;
- f) Investigar os efeitos do tratamento de reversão com cetamina, minociclina e amitriptilina sob a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos aos modelos animais de ECM e PM;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo número 021/2016-1.

#### 3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para o estudo foram utilizados ratos Wistar machos procedentes do biotério da UNESC pesando aproximadamente 250 a 330g. Os ratos ficaram abrigados em 5 por caixa com acesso a alimento e água *ad libitum* e serão mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ .

#### 3.3 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO MATERNA

No primeiro dia pós-natal as ninhadas foram abatidas a oito filhotes (quatro machos e quatro fêmeas, quando possível). Os filhotes foram privados da mãe durante 3 horas por dia, durante os 10 primeiros dias. A privação consiste em retirar a mãe da caixa e manter os filhotes na caixa original, para ficarem na presença do odor materno. Os animais não privados permaneceram imperturbáveis na gaiola original com sua mãe. As caixas em ambos os grupos só foram trocadas no 11<sup>o</sup> dia após o período pré-natal. Os ratos foram desmamados apenas no 22<sup>o</sup> dia após o período pré-natal e apenas os machos foram utilizados para o estudo, as fêmeas foram doadas para outros grupos de pesquisa. Todos os experimentos foram realizados apenas quando os animais atingirem a vida adulta (60 dias).

#### 3.4 PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO

Neste estudo foi utilizada uma metodologia previamente descrita por Gamaro et al. (2003) com algumas adaptações. O grupo controle permaneceu em suas caixas durante os 40 dias de indução de estresse, sem a aplicação do modelo e com mínima manipulação. Os

procedimentos de estresse foram aplicados por um período de 40 dias para o grupo estressado. Os seguintes estressores foram utilizados: 24 h de privação de comida, 24 h de privação de água, 1-3 h de contenção, 1.5-2 h de contenção a 4°C, exposição à luz estroboscópica durante 120-210 min, isolamento (2-3 dias). A contenção foi realizada pondo o animal em um tubo de plástico de 25 cm x 7 cm e ajustando este com fita tape para que o animal fosse incapaz de movimentar-se. Houve um buraco de 1 cm nas extremidades para respiração. A exposição à luz estroboscópica foi feita colocando-se o animal em um campo feito de madeira com 60 cm x 60 cm e 25 cm de profundidade, dividida em 16 células de 15 cm x 15 cm e 25 cm de profundidade, com a parte frontal feita de vidro. Foi utilizada uma lâmpada estroboscópica de 40 W que ficou piscando em uma frequência de 60 vezes/min. Os estressores foram aplicados em horários distintos todos os dias para minimizar a previsibilidade.

### 3.5 TRATAMENTO DE PREVENÇÃO

Para o tratamento de prevenção foi utilizado ômega-3 (0.72 g/kg; v.o.) ou N- acetilcisteína (NAC) (20 mg/kg; s.c.) ou ácido fólico (50 mg/kg; v.o.) para prevenção das alterações induzidas pelos protocolos de PM e ECM (Figuras 1 e 2). Após o protocolo de PM, ratos Wistar machos foram divididos em 8 grupos experimentais: 1) não-privado + salina; 2) não-privado + ômega-3; 3) não-privado + NAC; 4) não-privado + ácido fólico; 5) privado + salina; 6) privado + ômega-3; 7) privado + NAC; 8) privado + ácido fólico. Durante o protocolo de ECM, ratos Wistar machos foram divididos em 8 grupos experimentais: 1) controle + salina; 2) controle + ômega-3; 3) controle + NAC; 4) controle + ácido fólico; 5) estresse + salina; 6) estresse + ômega-3; 7) estresse + NAC; 8) estresse + ácido fólico. O tratamento foi realizado durante 20 dias (ômega-3 e ácido fólico uma vez/dia e NAC três vezes/dia). Após o tratamento, foram avaliadas as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelos protocolos de PM e de ECM e tratamento de prevenção, como descrito abaixo.

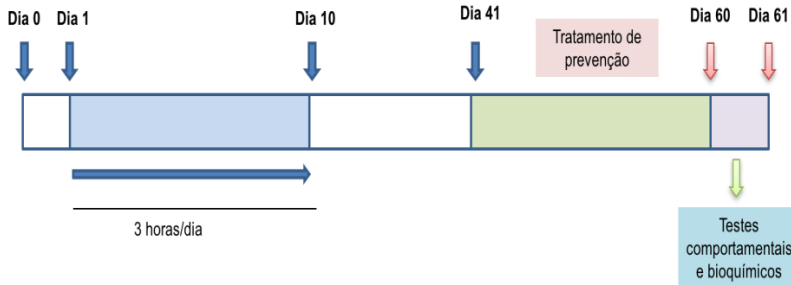


Figura 1 - Efeitos do tratamento de prevenção depois do protocolo de PM. O protocolo de PM foi realizado durante 10 dias após o primeiro dia pós-natal. Ratos machos adolescentes foram tratados com salina ou ômega -3 (0.72 g/kg) ou N-acetilcisteína (20 mg/kg) ou ácido fólico (50 mg/kg) durante 20 dias, até a fase adulta. Os testes do campo aberto e treino do teste do nado forçado foram realizados no 60º dia e o teste do nado forçado foi realizado no 61º dia 1h após a última administração do tratamento.

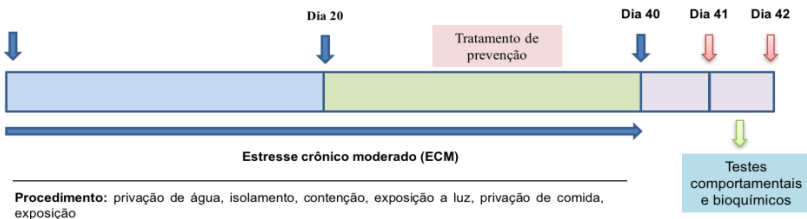


Figura 2 - Efeitos do tratamento de prevenção após o protocolo de ECM. O protocolo de ECM foi realizado durante 40 dias. Ratos machos adultos foram tratados com ômega-3 (0.72 g/kg) ou N-acetilcisteína (20 mg/kg) ou ácido fólico (50 mg/kg) durante 20 dias. Os testes do campo aberto e treino do nado forçado foram realizados no 41º dia e o teste do nado no 42º dia, 1 h após a última administração do tratamento.

### 3.6 TRATAMENTO DE REVERSÃO

Para o tratamento de reversão foi utilizado cetamina (15 mg/kg; ip) ou minociclina (25 mg/kg; ip) ou amitriptilina (10 mg/kg; ip) para reverter as alterações induzidas pelos protocolos de PM e ECM. Após o protocolo de PM, ratos Wistar machos adultos foram divididos em 8 grupos experimentais: 1) não-privado + salina; 2) não-privado + cetamina; 3) não-privado + minociclina; 4) não-privado + amitriptilina; 5) privado + salina; 6) privado + cetamina; 7) privado + minociclina; 8) privado + amitriptilina. Após o protocolo de ECM, ratos Wistar machos

adultos foram divididos em 8 grupos experimentais: 1) controle + salina; 2) controle + cetamina; 3) controle + minociclina; 4) controle + amitriptilina; 5) estresse + salina; 6) estresse + cetamina; 7) estresse + minociclina; 8) estresse + amitriptilina. A cetamina foi administrada uma única vez e o comportamento foi avaliado 15 dias após a administração. A minociclina e amitriptilina foram administradas uma vez por dia durante 20 dias. (Figura 3 e 4). Após o término dos tratamentos foram avaliadas as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelos protocolos de PM e ECM e o tratamento de reversão, como descrito abaixo.

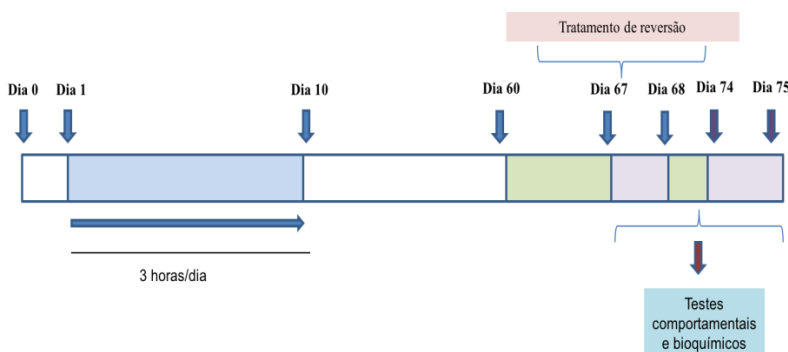


Figura 3 - Efeitos do tratamento de reversão após o protocolo de PM. O protocolo de PM foi realizado durante 10 dias após o primeiro dia pós-natal. Ratos machos adultos foram tratados com cetamina (15 mg/kg) ou minociclina (25 mg/kg) ou amitriptilina (10 mg/kg) ou salina. Os testes do campo aberto e treino do nado forçado foram realizados no 67º dia e o teste do nado forçado no 68º dia, oito dias após uma injeção única de cetamina. Ratos tratados com minociclina ou amitriptilina foram submetidos ao teste do campo aberto e treino do nado forçado no 74º dia e o teste do nado forçado foi realizado no 75º dia 1 h após a última administração do fármaco. O tratamento com minociclina ou amitriptilina começou no 60º dia e terminou no 75º dia.

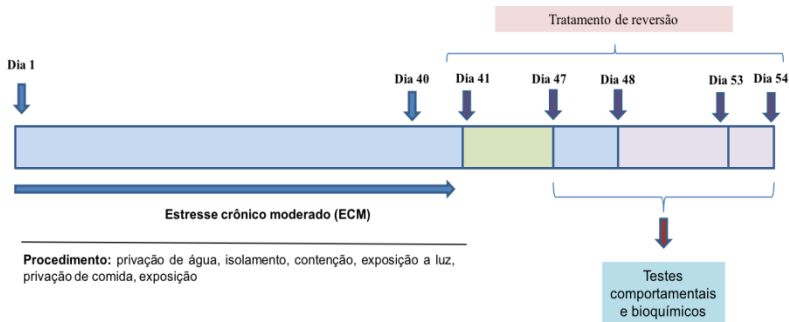


Figura 4 - Efeitos do tratamento de reversão após o protocolo de ECM. O protocolo de ECM foi realizado durante 40 dias. Ratos machos adultos foram tratados com cetamina (15 mg/kg) ou minociclina (25 mg/kg) ou amitriptilina (10 mg/kg). Os testes do campo aberto e treino do nado forçado foram realizados no 47º dia e o teste do nado forçado foi realizado no 48º dia, oito dias após uma única injeção de cetamina. Ratos tratados com minociclina ou amitriptilina foram submetidos ao teste do campo aberto e treino do nado forçado no 53º dia e o teste do nado forçado foi realizado no 54º dia, 1 h após a última administração do medicamento. O tratamento com minociclina ou amitriptilina começou no 41º dia e terminou no 54º dia.

## 3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 3.7.1 Teste do campo aberto

Foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto foi dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual exploram livremente o ambiente por 5 minutos. Foram contados pelo avaliador o número de cruzamentos e o número de levantamentos dos animais no período de 5 minutos.

### 3.7.2 TESTE DO NADO FORÇADO

Este teste consiste em dois dias de procedimentos no qual cada rato é posto em um cilindro com água a 23° C, a água deve ser suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. No período de treino, os animais foram forçados a nadar durante 15 minutos. No dia seguinte, (24 horas após o treino) no período de teste, cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Foram avaliados os

parâmetros de imobilidade, nos quais incluem imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar, parâmetros de nado, que incluem movimentos horizontais através da superfície da água, e parâmetros de escalada, movimentos verticais contra as paredes (Porsolt et al., 1977).

## 3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 3.8.1 Preparação do tecido e homogenado

Amostras de tecidos do CPF, hipocampo, amígdala e o NAc foram homogeneizados (1:10, w/v) em tampão SETH, pH 7,4 (250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 10 mM base Trizma, 50 UI/mL de heparina). Os homogenados foram centrifugados a 800 x g durante 10 minutos a 4o C. Os sobrenadantes foram mantidos a -80o C, até serem usados para a determinação da atividade enzimática. O intervalo máximo entre a preparação do homogenado e a análise enzimática foi sempre inferior a cinco dias. O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Lowry et al. (1951). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

### 3.8.2 Procedimentos de análise de estresse oxidativo

#### 3.8.2.1 Formação de TBARS

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de TBARS (Esterbauer e Cheeseman 1990). As amostras de tecido cerebral foram lavadas com PBS, colhidas e lisadas. As espécies reativas foram obtidas por hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetra-etoxi-propano (TEP) e foram utilizadas como padrão para a quantificação de TBARS. A cada tubo foi adicionado TBA a 0,67% e em seguida foram agitados. A mistura da reação foi incubada a 90°C durante 20 minutos e posteriormente as amostras foram colocadas em gelo. A densidade óptica de cada solução foi medida em um espectrofotômetro a 535 nm. Os dados foram expressos como nmol de equivalente malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

### 3.8.2.2 Formação de proteínas carbonil

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil. O conteúdo de proteínas carboniladas foi medido nas amostras homogeneizadas de cérebro utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) em um ensaio espectrofotométrico (Levine et al., 1990). Amostras de tecidos foram sonicadas em homogeneização gelada de tampão contendo inibidores de fosfatase e de protease (200 nM caliculina, 10 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de aprotinina, 1 mM de ortovanadato de sódio e 1 µM microcistina-LR) e centrifugadas a 1000 x g durante 15 minutos para sedimentar o material insolúvel. Trezentos microlitros de alíquotas do sobrenadante contendo 0,7-1,5 mg de proteína foram tratados com 300 µl de 10 mM de DNPH, dissolvido em HCl a 2M, e comparado com 2M de HCl sozinho (reagente branco). Em seguida as amostras foram incubadas no escuro sob agitação a cada 10 minutos, durante uma hora e à temperatura ambiente. As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (concentração final de 20%) e centrifugadas a 16,000 x g a 4°C, durante 15 minutos. O sedimento foi lavado por três vezes com 1 ml de etanol/acetato de etil (1:1 v/v). Os sedimentos foram seguidamente levemente agitados em vórtice e após, expostos à solução de lavagem durante 10 minutos antes da centrifugação (16,000 x g, durante 5 minutos). O sedimento final foi dissolvido em 1 ml de guanidina 6M e 10 mM de tampão fosfato trifluoroacético ácido, pH 2,3. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 16,000 x g, por 5 minutos. Absorbância foi registrada em um espectrofotômetro a 370 nm, tanto para as amostras tratadas com DNPH, quanto para o HCl sem DNPH. Os níveis de proteínas carboniladas foram expressos como nmol de carbonil por mg de proteína.

#### 3.8.2.3 Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase é um marcador importante para medir a infiltração de neutrófilos (De Young et al., 1989). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados (50 mg/ml) em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e centrifugados a 15,000 x g durante 40 minutos. A suspensão foi sonicada por três vezes durante 30s. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM de tetrametilbenzidina e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade foi medida espectrofotometricamente como a variação de absorbância em 650 nm a 37°C. Os dados foram representados como mU por mg de proteína.



### 3.8.2.4 Atividade da enzima SOD

A estimativa da SOD foi realizada com base em sua capacidade para inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina para adrenocromo (Bannister e Calabrese, 1987). Uma combinação de 2,78 ml de tampão carbonato de sódio (0,05 mM; pH 10,2), 100 µl de EDTA (1,0 mM), e 20 µl do sobrenadante ou sacarose (branco) foi incubada a 30°C, durante 45 minutos. Em seguida, a reação foi iniciada após adição de 100 µl de solução de adrenalina (9,0 mM). A variação na absorbância foi registrada a 480 nm, durante 8 minutos. Durante todo o procedimento do ensaio, a temperatura foi mantida a 30°C. Uma unidade de SOD produziu aproximadamente 50% de auto-oxidação de adrenalina. Os resultados foram expressos em unidades/mg de proteína.

### 3.8.2.5 Atividade da enzima CAT

A atividade da CAT foi medida através do método que utiliza o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para gerar H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (Aebi 1984). As amostras de tecido cerebral foram sonicadas em 50 mmol/l de tampão fosfato (pH 7,0). A suspensão resultante foi centrifugada a 3000 x g, durante 10 min. A alíquota de amostra (20 µl) foi adicionada a 980 µl da mistura de substrato. A mistura de substrato continha 0,3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 50 ml de tampão fosfato a 0,05 M (pH 7,0). As absorbâncias inicial e final foram registradas a 240 nm, após 1 e 6 minutos, respectivamente. Uma curva padrão foi estabelecida, utilizando-se catalase purificada (Sigma, MO, EUA) nas mesmas condições.

## 3.8.3 Procedimentos de análise de estresse nitrosativo

### 3.8.3.1 Medida da concentração de nitrito/nitrato

As concentrações totais de nitrito foram medidas através da reação de Griess. A reação consiste em adicionar 100 µl de reagente de Griess 0,1% (w/v) naftil etilenediamida dicloridrato em H<sub>2</sub>O e 1% (w/v) de sulfanilamida em 5% (v/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado, vol. [1:1] para a amostra de 100 µl. A absorbância foi registrada em um espectrofotômetro a 550 nm (Green et al., 1982). Os resultados foram registrados como nmol da concentração de nitrito/nitrato por mg de proteína.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos experimentais na avaliação do teste do campo aberto e nado forçado e de todos os ensaios bioquímicos foram determinadas por análise de variância de uma via (ANOVA). Quando o valor de F foi significativo, foi realizado o teste *post hoc* de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de  $p$  menores do que 0,05. Os grupos foram comparados com controle tratados com salina, sendo representados quando significativos por \*. Os grupos estresse por PM ou ECM onde foi utilizadas estratégias de prevenção e reversão foram comparados com os grupos estresse tratados com salina, sendo representado quando significativos por #.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM

A Figura 5A ilustra os efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de ECM. O grupo controle tratado com amitriptilina e os grupos estressados tratado com salina e minociclina aumentaram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em comparação com o grupo controle tratado com salina, porém, o grupo estressado tratado com cetamina diminuiu o tempo de imobilidade quando comparado com o grupo estressado tratado com salina ( $F_{(7-75)} = 2,993$ ;  $p = 0,008$ ; Fig. 5A).

A atividade locomotora espontânea é representada na Figura 5B. Os grupos estressados tratados com salina, cetamina e amitriptilina diminuíram o número de crossings em comparação com o grupo controle tratado com salina ( $F_{(7-76)} = 4,560$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 5B). Não foi encontrada diferença estatística no número de rearings em nenhum dos grupos experimentais ( $F_{(7-76)} = 1,835$ ;  $p = 0,094$ ; Fig. 5B).

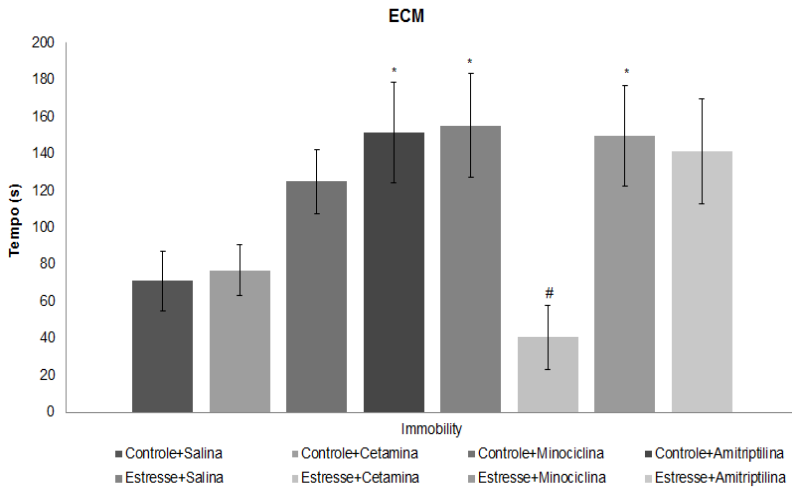


Figura 5A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

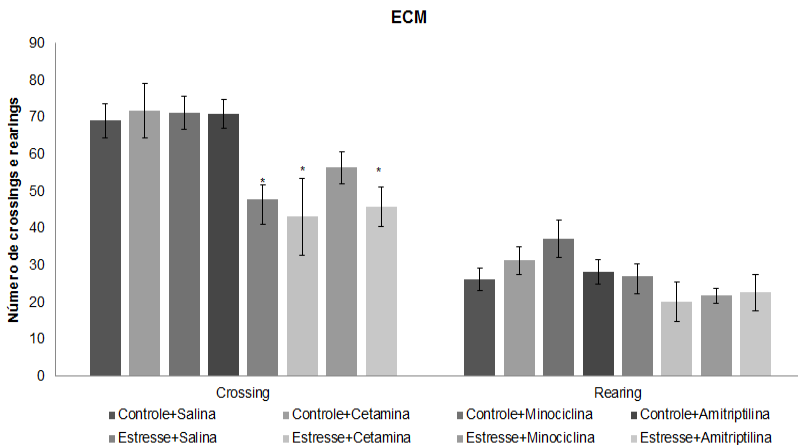


Figura 5B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do campo aberto em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM

A Figura 6 mostra os efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os parâmetros de estresse oxidativo em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao protocolo de ECM. Os níveis de MDA, um marcador de dano lipídico, foram aumentados no grupo estressado tratado com salina em comparação com o grupo controle tratado com salina no CPF ( $F_{(7-39)} = 6,201$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6A). Na amígdala, os níveis de MDA foram aumentados nos grupos estressados tratados com cetamina, minociclina e amitriptilina quando comparado com o grupo controle tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 27,419$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6A). No hipocampo, os níveis de MDA aumentaram nos grupos estressados tratados com salina, cetamina, minociclina e amitriptilina em comparação com o grupo controle tratado com salina; e diminuíram nos grupos estressados tratados com cetamina e amitriptilina em comparação com o grupo estressado tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 29,403$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6A). Por fim, no NAc, os níveis de MDA foram aumentados no grupo estresse tratado com salina, minociclina e amitriptilina em comparação com o grupo controle tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 9,638$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6A).

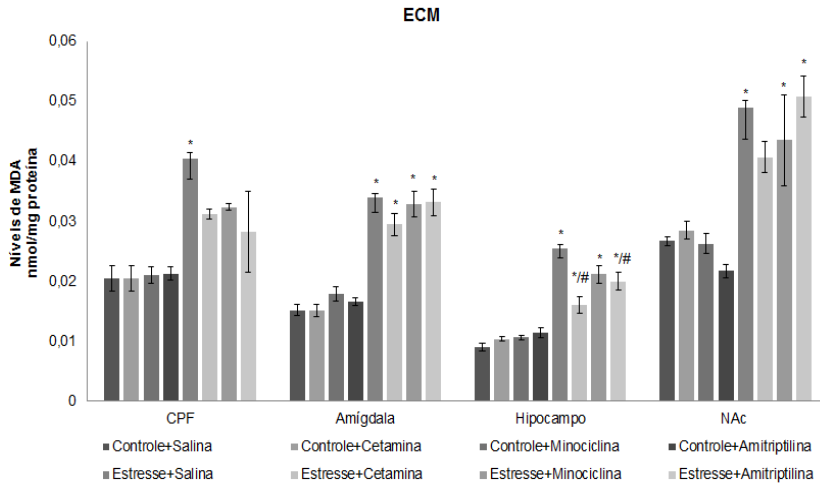


Figura 6A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 6B demonstra que no CPF houve um aumento nos níveis da carbonilação de proteínas nos grupos estressados tratados com salina, cetamina e minociclina quando comparado com o grupo controle tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 12,06$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6B). Não foi encontrada diferença estatística nos níveis da carbonilação de proteínas na amígdala ( $F_{(7-39)} = 1,09$ ;  $p = 0,393$ ; Fig. 6B), hipocampo ( $F_{(7-39)} = 1,609$ ;  $p = 0,169$ ; Fig. 6B) e NAc ( $F_{(7-39)} = 1,514$ ;  $p = 0,188$ ; Fig. 6B).

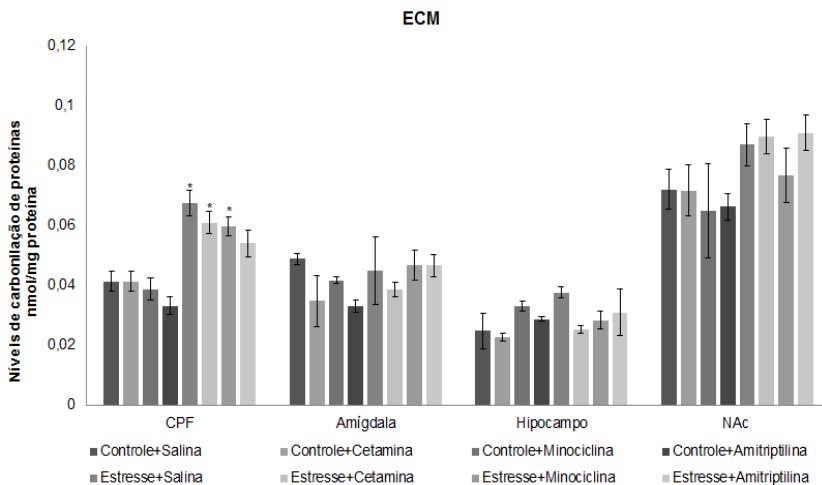


Figura 6B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis de carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

O resultado da atividade da mieloperoxidase é ilustrado na Figura 6C. No CPF houve um aumento da atividade da mieloperoxidase nos grupos estressados tratados com salina, cetamina e minociclina quando comparado com o grupo controle tratado com salina, e ainda, houve uma diminuição no grupo estressado tratado com amitriptilina quando comparado com o grupo estressado tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 13,451$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6C). Na amígdala, a atividade da mieloperoxidase foi diminuída no grupo estressado tratado com cetamina quando comparado com os grupos controle e estresse tratados com salina ( $F_{(7-39)} = 4,213$ ;  $p = 0,002$ ; Fig. 6C). No hipocampo ( $F_{(7-39)} = 26,665$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6C) e no NAc ( $F_{(7-39)} = 14,6$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6C) houve um aumento da atividade da mieloperoxidase no grupo estressado tratado com salina quando comparado ao grupo controle tratado com salina e esses efeitos não foram revertidos por nenhum dos tratamentos.

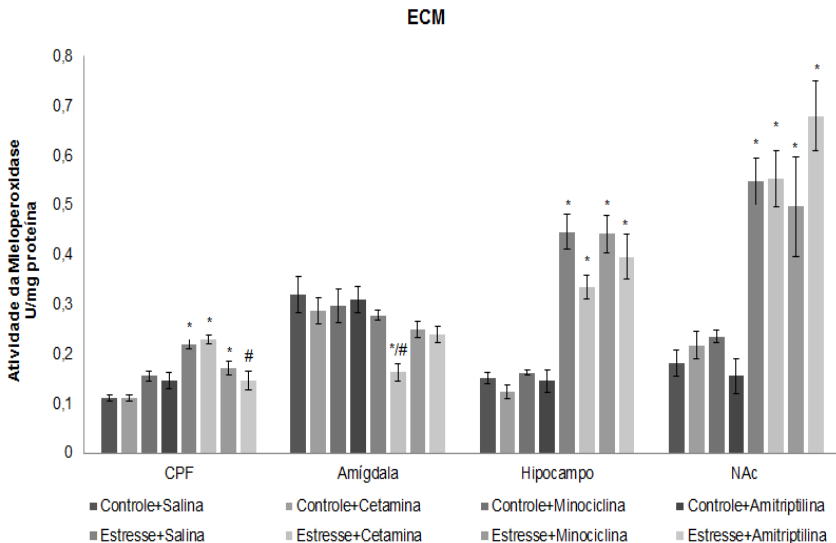


Figura 6C - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 6D demonstra que no CPF houve um aumento na concentração de nitrito/nitrato no grupo estressado tratado com amitriptilina quando comparado ao grupo controle tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 5,104$ ;  $p = 0,001$ ; Fig. 6D). Na amígdala, houve um aumento na concentração de nitrito/nitrato nos grupos estressados tratados com minociclina e amitriptilina em comparação com o grupo controle tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 5,7783$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6D). No hipocampo, a concentração de nitrito/nitrato esteve aumentada nos grupos estressados tratados com salina e amitriptilina em comparação com o grupo controle tratado com salina, e, além disso, houve uma diminuição no grupo estressado tratado com cetamina em comparação com o grupo estressado tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 7,701$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 6D). Não foi encontrada diferença estatística na concentração de nitrito/nitrato no NAc ( $F_{(7-39)} = 2,351$ ;  $p > 0,05$ ; Fig. 6D).



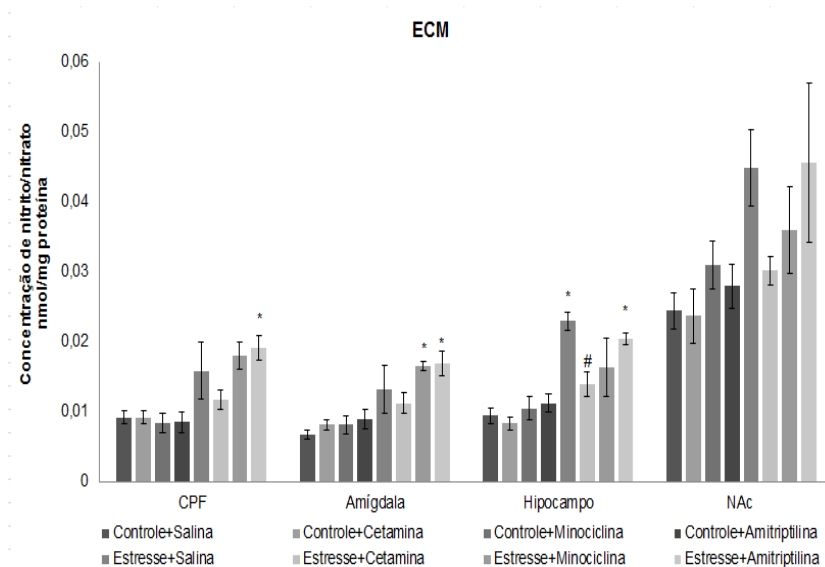


Figura 6D - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM

A Figura 7 ilustra os efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nas estruturas cerebrais de ratos submetidos ao protocolo de ECM. Na amígdala ( $F_{(7-39)} = 37,098$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 7A), hipocampo ( $F_{(7-39)} = 28,97$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 7A) e no NAc ( $F_{(7-39)} = 23,18$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 7A), a atividade da SOD diminuiu e esses efeitos não foram revertidos por nenhum dos tratamentos. Não foi encontrada diferença estatística na atividade da SOD no CPF ( $F_{(7-39)} = 0,88$ ;  $p = 0,533$ ; Fig. 7A).

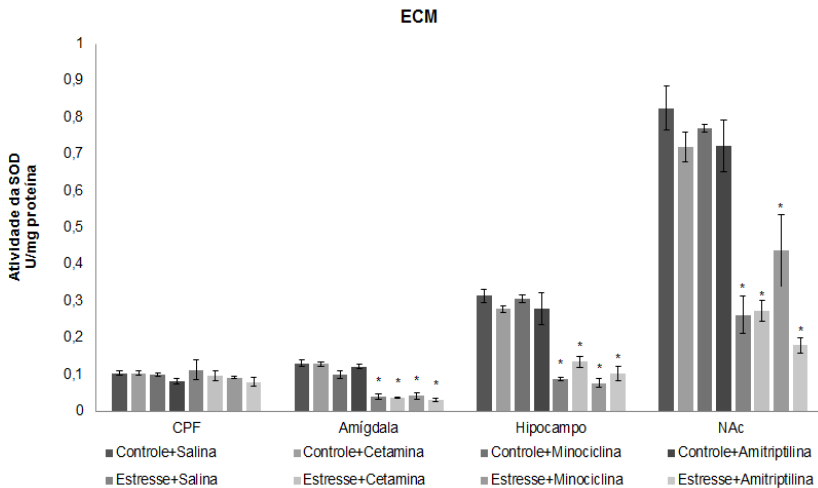


Figura 7A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 7B demonstra que na amígdala ( $F_{(7-39)} = 31,161$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 7B), hipocampo ( $F_{(7-39)} = 28,97$ ;  $p < 27,18$ ; Fig. 7B) e no NAc ( $F_{(7-39)} = 17,633$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 7B) a atividade de CAT diminuiu no grupo de estressado tratado com solução salina em comparação ao grupo controle tratado com solução salina e esses efeitos não foram revertidos por nenhum dos tratamentos. Não foi encontrada diferença estatística na atividade SOD no CPF ( $F_{(7-39)} = 1,228$ ;  $p = 0,317$ ; Fig. 7B).

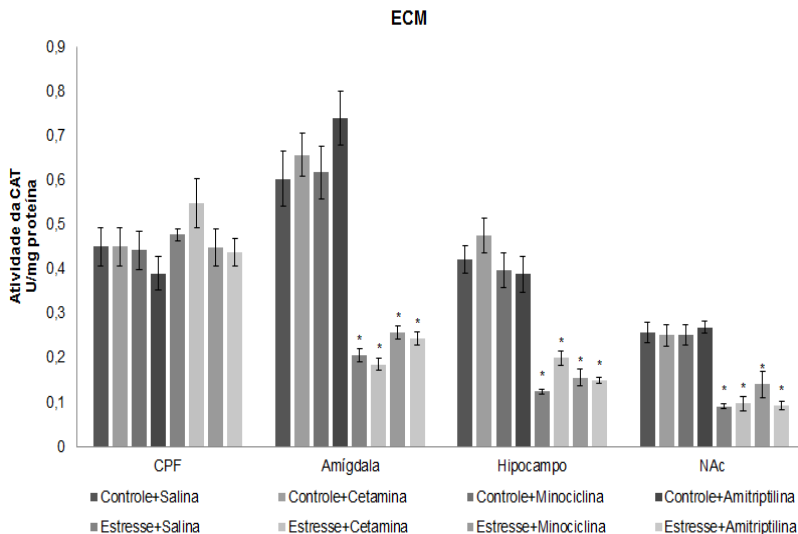


Figura 7B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc de ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM

A Figura 8A ilustra os efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do nado forçado nos ratos submetidos ao protocolo de PM. O grupo privado tratado com salina teve um aumento no tempo de imobilidade em comparação com grupo não privado tratado com salina, porém, os ratos privados tratados com cetamina, minociclina e amitriptilina diminuíram o tempo de imobilidade em comparação com o grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-80)} = 4,758$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 8A).

O resultado da atividade locomotora espontânea é demonstrado na Figura 8B. Não foram encontradas diferenças estatísticas no número de crossings ( $F_{(7-107)} = 2,639$ ;  $p > 0,05$ ; Fig. 8B) e rearings ( $F_{(7-104)} = 2,019$ ;  $p = 0,60$ ; Fig. 8B) em nenhum dos grupos.

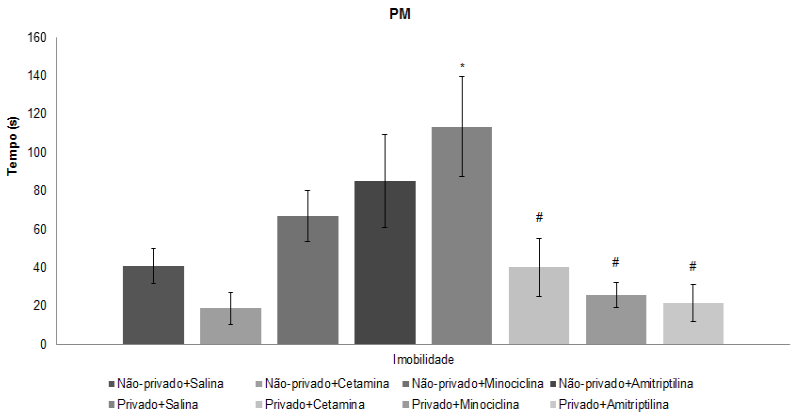


Figura 8A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

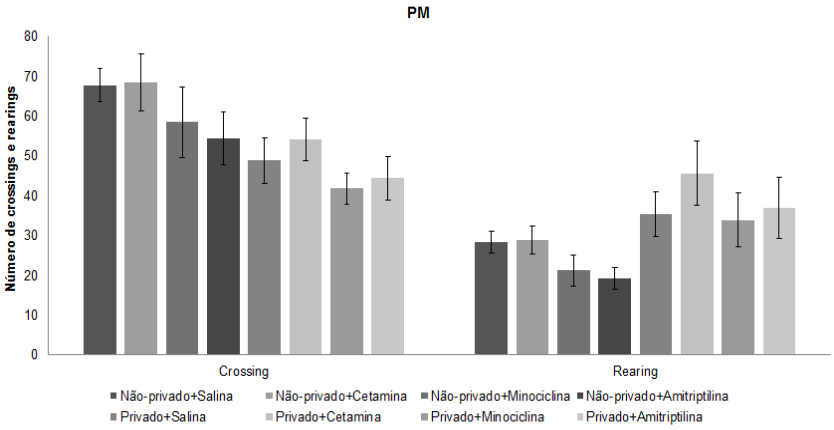


Figura 8B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina no teste do campo aberto em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média ± EPM.

#### 4.5 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM

A Figura 9 mostra os efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina nos parâmetros de estresse oxidativo nas estruturas cerebrais de ratos submetidos ao protocolo de privação materna. No CPF, os níveis de MDA foram diminuídos no grupo privado tratado com minociclina em comparação com o grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 2,667$ ;  $p = 0,028$ ; Fig. 9A). Na amígdala, os níveis de MDA foram diminuídos no grupo privado tratado com minociclina em comparação com o grupo não-privado e privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 4,573$ ;  $p = 0,001$ ; Fig. 9A). No hipocampo, houve um aumento nos níveis de MDA nos ratos privados tratados com salina e minociclina quando comparado com o grupo não-privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 5,429$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 9A). Não foi encontrada diferença estatística nos níveis de MDA no NAc ( $F_{(7-38)} = 3,853$ ;  $p > 0,05$ ; Fig. 9A).

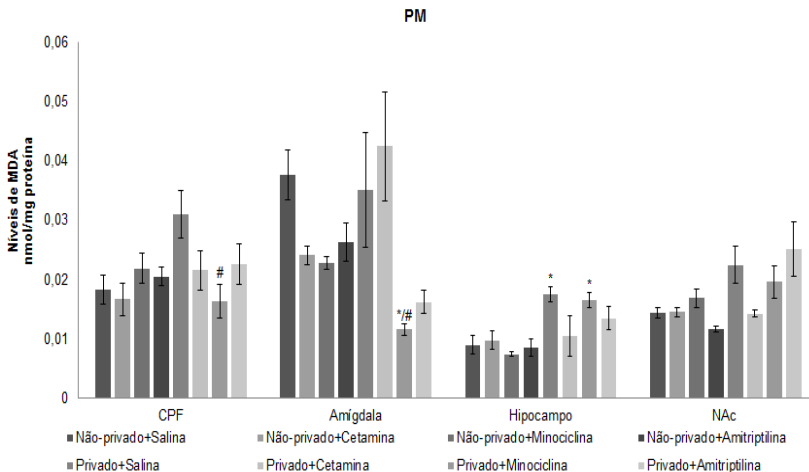


Figura 9A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 9B demonstra que, na amígdala, houve um aumento nos níveis da carbonilação de proteínas nos grupos privados tratados com salina, minociclina e amitriptilina em comparação com o grupo não-privado tratado com salina, e ainda, houve uma diminuição no grupo privado tratado com cetamina em comparação com o grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 10,034$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 9B). No hipocampo, os níveis da carbonilação de proteína estiveram aumentados nos grupos privados tratados com salina e amitriptilina em comparação com o grupo não-privado tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 1,152$ ;  $p < 0,05$ ; Fig. 9B). Não foram encontradas diferenças estatísticas nos níveis da carbonilação de proteínas no CPF ( $F_{(7-38)} = 2,425$ ;  $p = 0,06$ ; Fig. 9B) e no NAc ( $F_{(7-38)} = 4,062$ ;  $p = 0,062$ ; Fig. 9B).

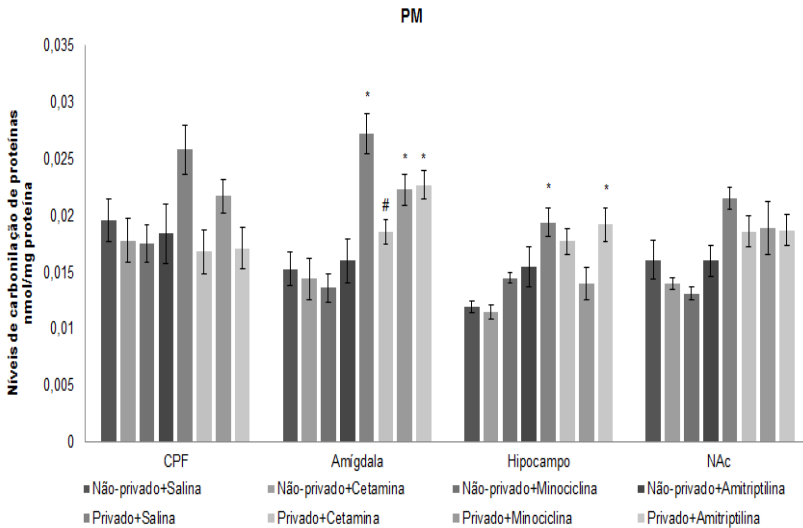


Figura 9B - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

O resultado da atividade da mieloperoxidase é demonstrado na Figura 9C. No CPF, existiu um aumento na atividade da mieloperoxidase nos ratos privados tratados com salina em comparação com o grupo não-privado tratado com salina, e ainda, o grupo privado tratado com amitriptilina apresentou uma diminuição em relação ao

grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 3,749$ ;  $p = 0,005$ ; Fig. 9C). No hipocampo, houve um aumento da atividade da mieloperoxidase nos ratos privados tratados com salina em comparação aos não-privados tratados com salina, porém, os ratos privados tratados com cetamina, minociclina e amitriptilina apresentaram uma diminuição na atividade da mieloperoxidase em comparação aos privados tratados com salina ( $F_{(7-38)} = 7,983$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 9C). No NAc, a atividade da mieloperoxidase esteve diminuída no grupo privado tratado com minociclina em comparação ao grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-37)} = 2,760$ ;  $p = 0,024$ ; Fig. 9C). Não foi encontrada diferença estatística na atividade da mieloperoxidase na amígdala ( $F_{(7-38)} = 2,511$ ;  $p = 0,052$ ; Fig. 9C).

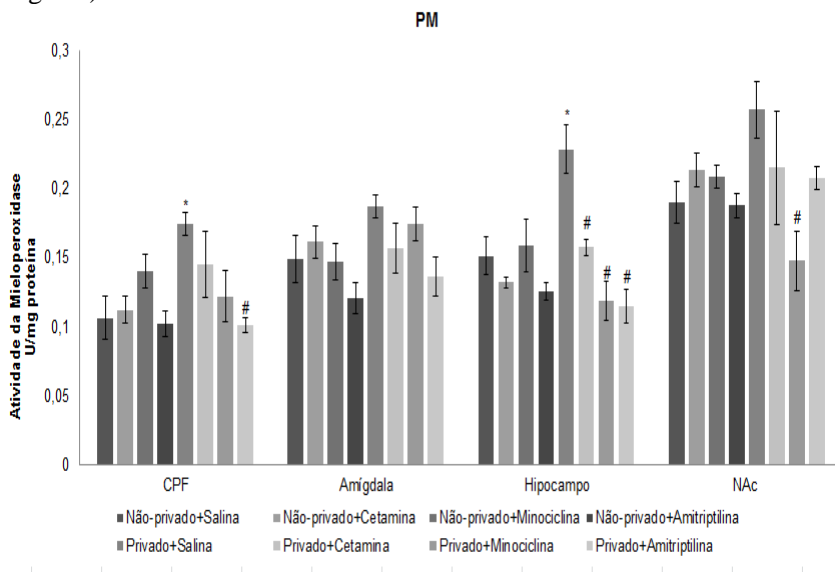


Figura 9C - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 9D ilustra que, na amígdala, houve uma diminuição da concentração de nitrito/nitrato nos ratos privados tratados com cetamina e minociclina quando comparado com o grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 5,088$ ;  $p = 0,001$ ; Fig. 9D). No hipocampo, houve um aumento na concentração de nitrito/nitrato no grupo privado tratado com

salina, cetamina e amitriptilina em comparação ao grupo não-privado tratado com salina, porém, no grupo privado tratado com minociclina existiu uma diminuição em comparação ao grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 12,139$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 9D). No NAc, a concentração de nitrito/nitrato esteve aumentada no grupo privado tratado salina e cetamina em comparação ao grupo não-privado tratado com salina, e ainda, os grupos privados tratados com minociclina e amitriptilina diminuíram a concentração de nitrito/nitrato em comparação ao grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-37)} = 7,921$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 9D). Não foi encontrada diferença estatística na concentração de nitrito/nitrato no CPF ( $F_{(7-31)} = 2,564$ ;  $p = 0,067$ ; Fig. 9D).

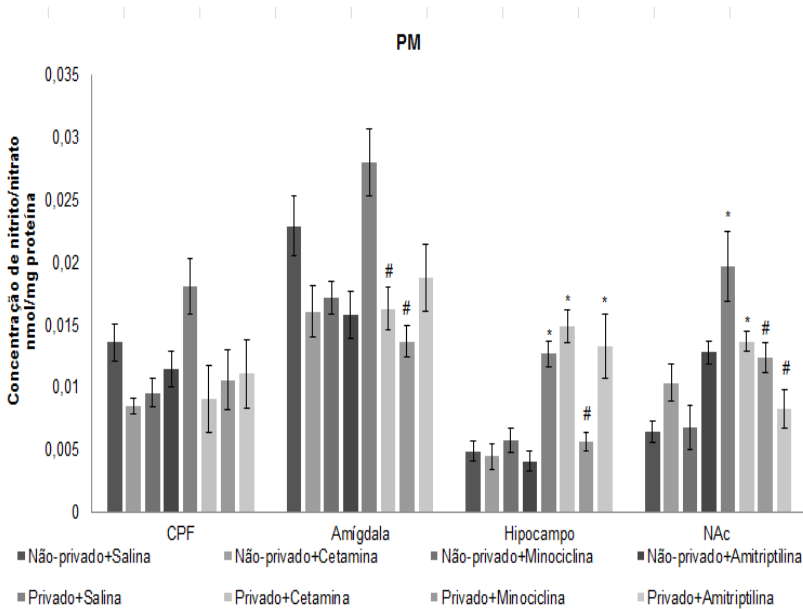


Figura 9D - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.



#### 4.6 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA, MINOCICLINA E AMITRIPTILINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM

A Figura 10 mostra os efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nas estruturas cerebrais de ratos submetidos ao protocolo de PM. No CPF, houve uma diminuição da atividade da SOD nos ratos privados tratados com salina, cetamina e amitriptilina quando comparado ao grupo não-privado tratado com salina, no entanto, o grupo privado tratado com minociclina teve um aumento na atividade da SOD em comparação ao grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 10,844$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 10A). Na amígdala, houve uma diminuição na atividade da SOD no grupo privado tratado com salina em comparação ao grupo não-privado tratado com salina, porém, no grupo privado tratado com minociclina existiu um aumento da atividade da SOD quando comparado com o grupo privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 3,089$ ;  $p = 0,014$ ; Fig. 10A). No hipocampo, a atividade da SOD esteve aumentada no grupo privado tratado com minociclina em comparação ao grupo não-privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 9,394$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 10A). No NAc, houve uma diminuição na atividade da SOD nos grupos privados tratados com salina, cetamina e amitriptilina em comparação ao grupo não-privado tratado com salina ( $F_{(7-38)} = 7,835$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 10A).

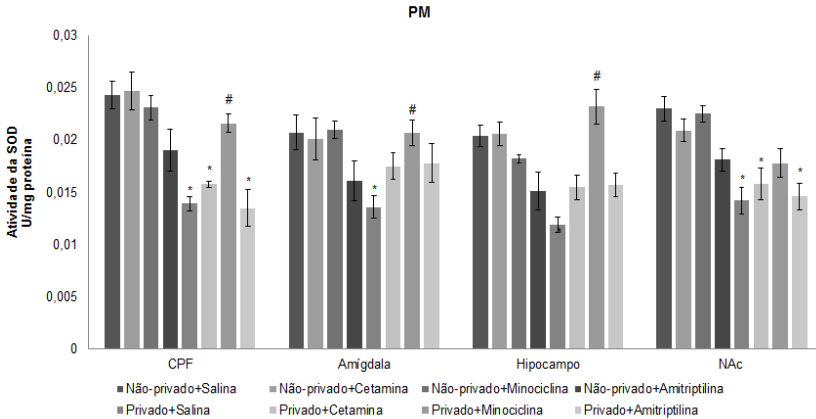


Figura 10A - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 10B mostra que existiu um aumento na atividade no grupo privado tratado com minociclina e amitriptilina em comparação ao grupo privado tratado com salina no CPF ( $F_{(7-38)} = 3,001$ ;  $p = 0,016$ ; Fig. 10B). Na amígdala, houve uma diminuição na atividade da CAT no grupo privado tratado com salina quando comparado ao grupo não-privado tratado com salina ( $F_{(7-39)} = 5,423$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 10B). No hipocampo, a atividade da CAT esteve diminuída nos grupos privados tratados com salina, cetamina, minociclina e amitriptilina em comparação ao grupo não-privado tratado salina ( $F_{(7-38)} = 11,335$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 10B). Não foi encontrada diferença estatística na atividade da CAT no NAc ( $F_{(7-37)} = 2,760$ ;  $p = 0,064$ ; Fig. 10B).

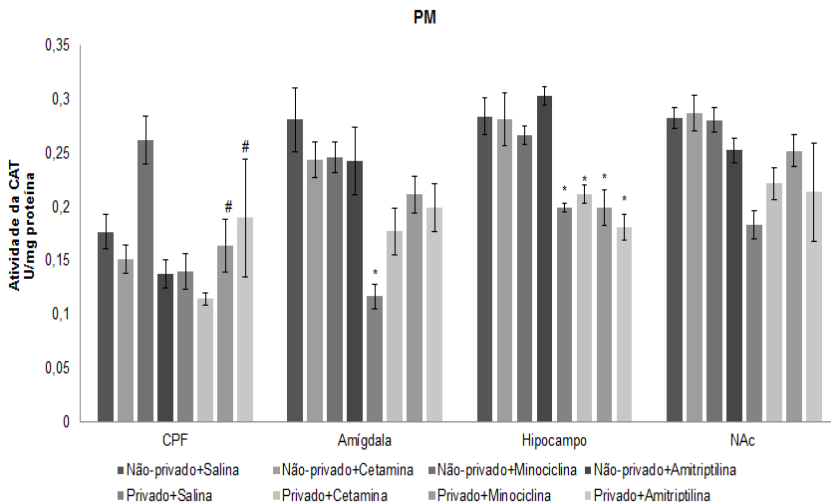


Figura 10 - Efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre a atividade da CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.7 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM

Os efeitos do ECM e do tratamento com NAC, ômega-3 e ácido fólico estão representados na Figura 11. Ratos do grupo controle e tratados com NAC e ácido fólico, bem como, ratos do grupo estresse tiveram um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, comparado ao grupo controle tratado com água. Por outro lado, ratos do grupo estresse e tratados com ácido fólico tiveram uma diminuição no tempo de imobilidade, quando comparado ao grupo estresse ( $F_{(7-84)} = 2,177$ ;  $p = 0,045$ ; Fig. 11A). O número de crossings ( $F_{(7-85)} = 0,525$ ;  $p = 0,813$ ; Fig. 11B) e rearings ( $F_{(7-85)} = 1,672$ ;  $p = 0,128$ ; Fig. 11B) não foi alterado após o estresse ou tratamento com NAC, ácido fólico e ômega-3.

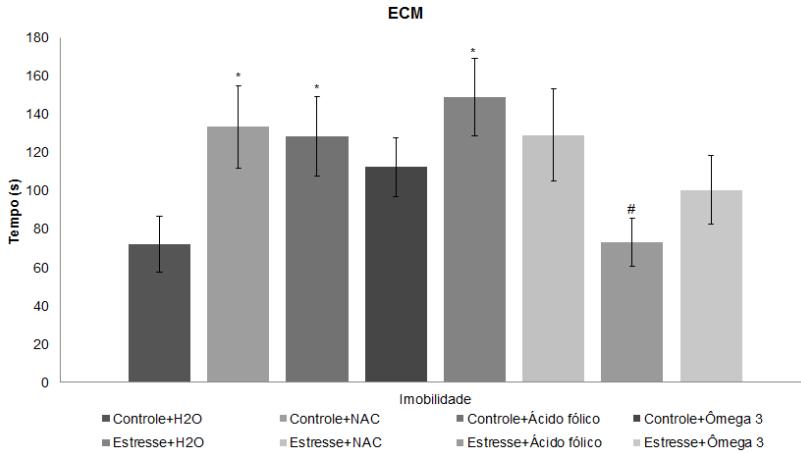


Figura 11A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico no teste do nado forçado em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

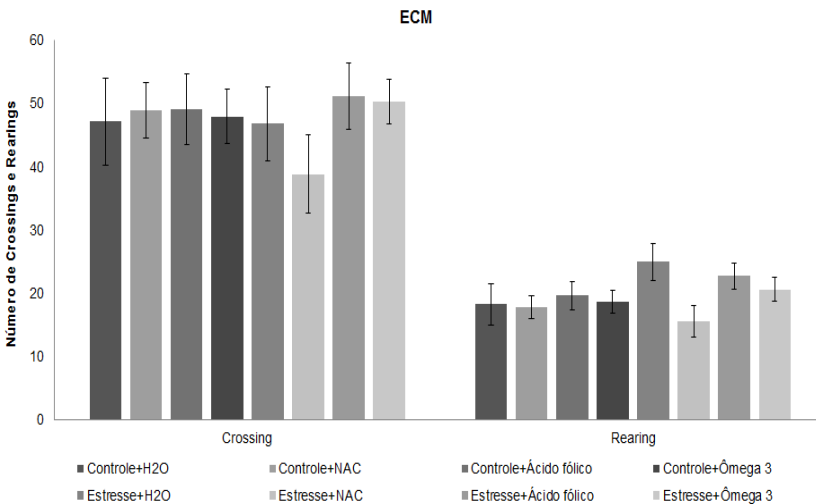


Figura 11B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico no teste do campo aberto em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM.

#### 4.8 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM

Na figura 12 estão representados os resultados de dano em lipídeos em cérebro de ratos submetidos ao estresse crônico moderado e tratados com NAC, ácido fólico e ômega-3. No CPF ocorreu um aumento nos níveis de MDA de ratos do grupo estresse, comparado com o grupo controle; porém, no CPF de ratos do grupo estresse tratados com NAC e ácido fólico os níveis de MDA foram reduzidos ( $F_{(7-47)} = 18,150$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12A). No hipocampo os níveis de MDA foram elevados no grupo estresse. O tratamento com NAC e ômega-3 reduziu os níveis de MDA no hipocampo de ratos do grupo estresse; entretanto, o tratamento com ácido fólico aumentou os níveis de MDA no hipocampo ( $F_{(7-44)} = 5,084$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12A). Na amígdala ( $F_{(7-47)} = 7,512$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12A) e no NAc ( $F_{(7-46)} = 2,359$ ;  $p = 0,041$ ; Fig. 12A) os níveis de MDA foram aumentados no grupo estresse; porém, o tratamento com ácido fólico, NAC e ômega-3 foi capaz de reverter essas alterações na amígdala.

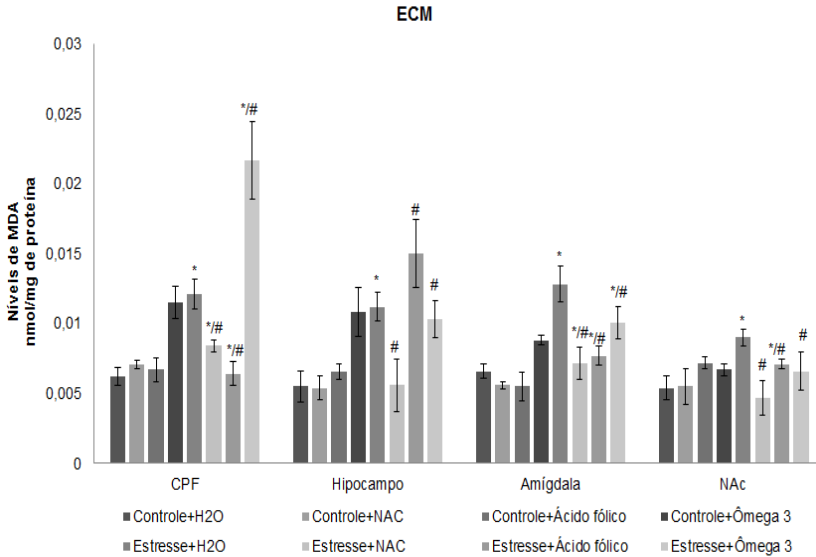


Figura 12A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAC em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Os níveis de carbonilação de proteínas foram aumentados no CPF ( $F_{(7-47)} = 10,003$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12B), hipocampo ( $F_{(7-44)} = 11,937$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12B), amígdala ( $F_{(7-48)} = 23,666$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12B), e NAC ( $F_{(7-47)} = 14,514$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12B). Interessantemente, o tratamento com NAC, ácido fólico e ômega-3 reduziu os níveis de carbonilação de proteínas em todas as áreas cerebrais analisadas dos ratos do grupo estresse.

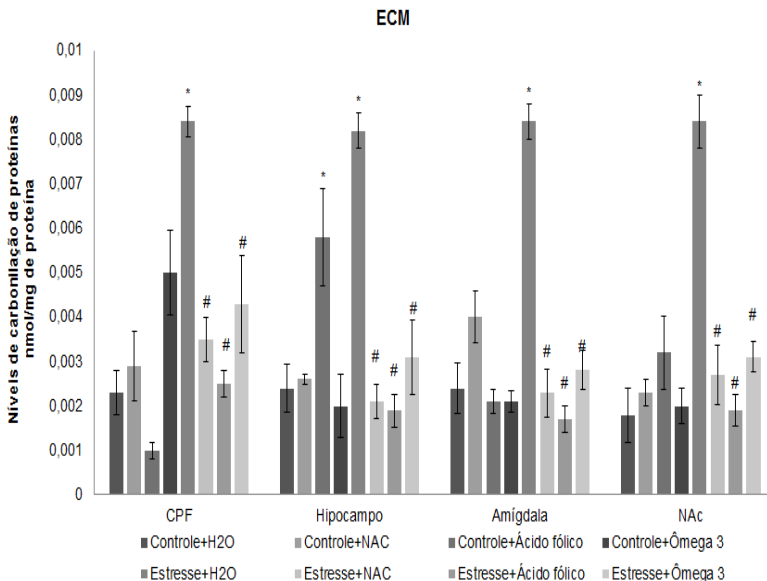


Figura 12B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A atividade da mieloperoxidase aumentou no hipocampo ( $F_{(7-44)} = 11,932$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12C), na amígdala ( $F_{(7-39)} = 13,259$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12C) e no NAc ( $F_{(7-40)} = 14,638$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12D) de ratos do grupo estresse. O tratamento com NAC reduziu a atividade da mieloperoxidase na amígdala de ratos do grupo estresse e o tratamento com ácido fólico e ômega-3 reduziu a atividade da mieloperoxidase no NAc.

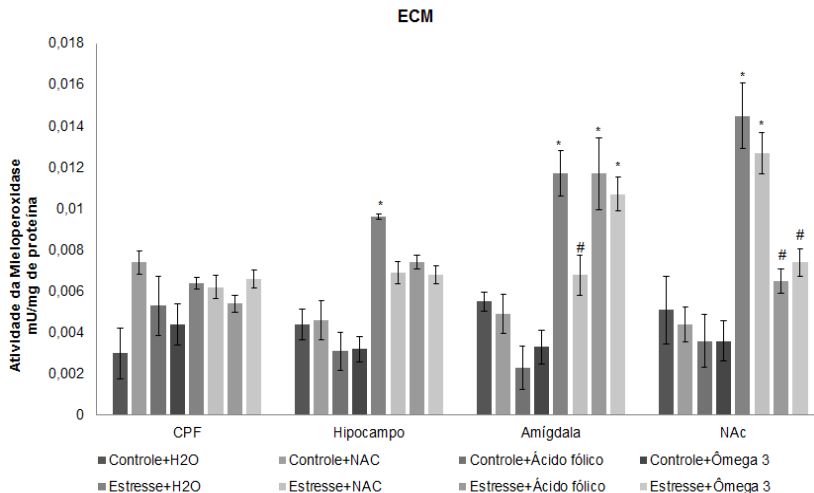


Figura 12C - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A concentração de nitrato/nitrato foi reduzida no CPF de ratos do grupo estresse tratados com NAC e ácido fólico ( $F_{(7-47)} = 6,815$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12D). No hipocampo houve um aumento na concentração de nitrato/nitrato de ratos do grupo estresse, comparado aos grupos controle ou estresse tratados com água ( $F_{(7-44)} = 12,962$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12D). A concentração de nitrato/nitrato foi aumentada nos grupos estresse tratados com água ou ômega-3 na amígdala ( $F_{(7-46)} = 7,214$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12D) e NAc ( $F_{(7-47)} = 15,832$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 12D). Porém, o tratamento com NAC e ácido fólico reduziram a concentração de nitrato/nitrato na amígdala e no NAc.



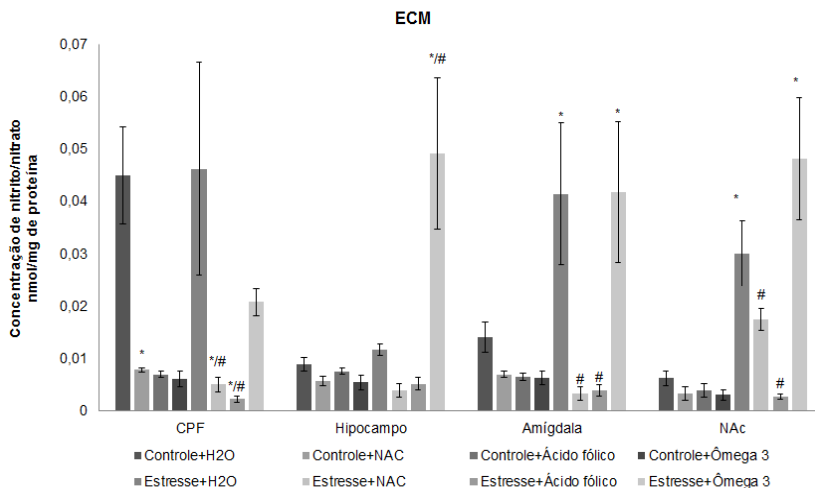


Figura 12D - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.9 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ECM

A atividade da SOD aumentou no CPF ( $F_{(7,47)} = 4,160$ ;  $p = 0,002$ ; Fig. 13A) e hipocampo ( $F_{(7,44)} = 9,947$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 13A) de ratos do grupo estresse e tratados com ácido fólico e ômega-3. Na amígdala a atividade da SOD diminuiu em ratos do grupo estresse, e aumentou em ratos do grupo controle tratado com NAC e estressados tratados com ácido fólico ( $F_{(7,47)} = 10,893$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 13A). Além disso, no NAc houve um aumento na atividade da SOD de ratos do grupo controle tratados com NAC e do grupo estresse tratados com ácido fólico ( $F_{(7,45)} = 5,965$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 13A).

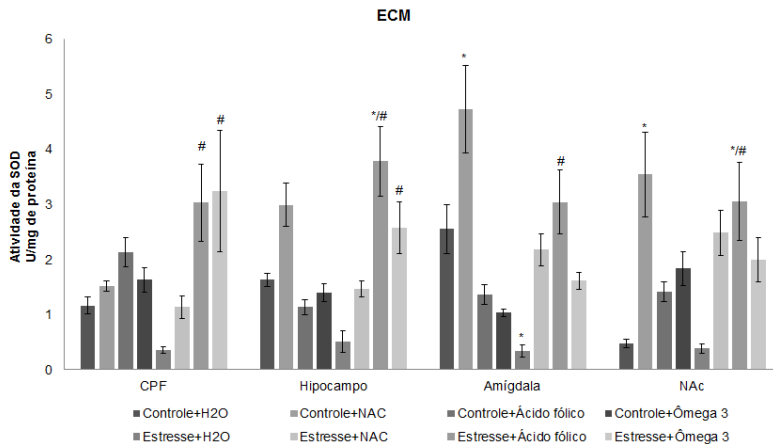


Figura 13A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A atividade da CAT aumentou no CPF de ratos do grupo estresse e tratados com ácido fólico e ômega-3, comparado com os grupos controle e estresse tratados com água ( $F_{(7-47)} = 9,655$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 13B). No hipocampo ocorreu um aumento na atividade da CAT em ratos grupo estresse tratados com ômega-3 ( $F_{(7-44)} = 18,490$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 13B), e na amígdala ( $F_{(7-47)} = 5,405$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 13B) e NAc ( $F_{(7-48)} = 13,497$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 13B) de ratos do grupo estresse e tratados com ácido fólico.

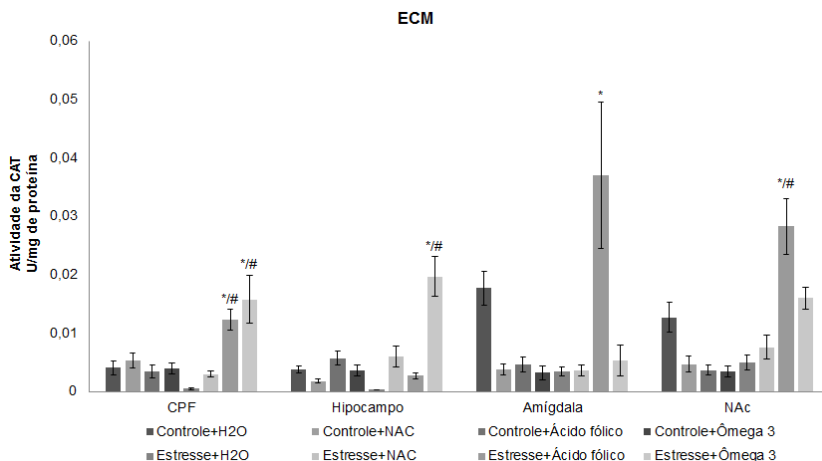


Figura 13B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de ECM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.10 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO NO COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM

Em ratos submetidos a PM e ratos não-privados tratados com ômega-3 foi observado um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, quando comparado com ratos não-privados tratados com água. Por outro lado, em ratos submetidos a PM e tratados com ácido fólico e ômega-3 foi encontrado uma diminuição no tempo de imobilidade, comparado com ratos do grupo privado tratados com água ( $F_{(7-68)} = 2,372$ ;  $p = 0,033$ ; Fig. 14A). O número de crossings ( $F_{(7-66)} = 1,339$ ;  $p = 0,248$ ; Fig. 14B) e rearings ( $F_{(7-66)} = 0,322$ ;  $p = 0,941$ ; Fig. 14B) não foi alterado pela PM ou o tratamento com NAC, ácido fólico e ômega-3.



#### 4.11 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM

Os níveis de MDA estão ilustrados na figura 15A. Em ratos submetidos a PM houve um aumento no CPF ( $F_{(7-44)} = 28,250$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15A), no hipocampo ( $F_{(7-44)} = 9,206$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15A), amígdala ( $F_{(7-45)} = 17,322$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15A) e NAc ( $F_{(7-46)} = 18,047$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15A), quando comparado com ratos do grupo não-privado. Porém, o tratamento com NAC, ácido fólico e ômega-3 reverteu o aumento nos níveis de MDA induzidos pela PM.

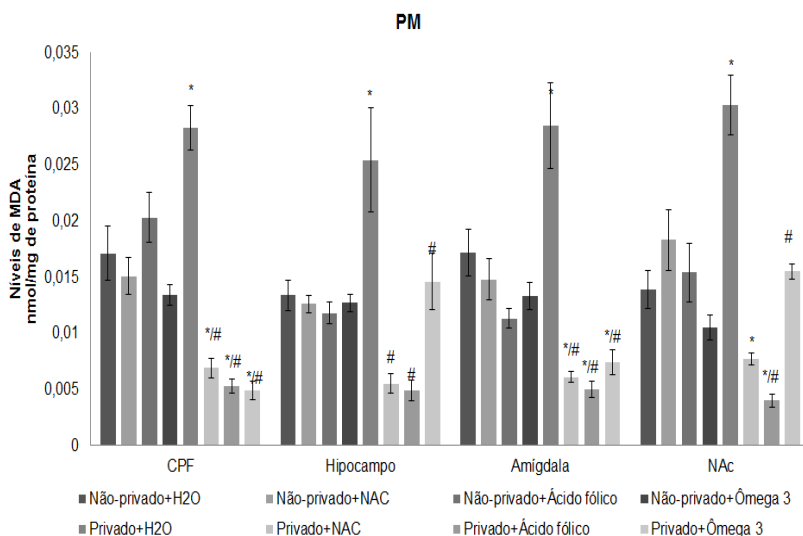


Figura 15A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de MDA no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Os níveis de carbonilação de proteínas também foram elevados no CPF ( $F_{(7-44)} = 17,830$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15B), hipocampo ( $F_{(7-45)} = 19,349$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15B), amígdala ( $F_{(7-45)} = 27,482$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15B) e NAc ( $F_{(7-46)} = 23,597$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15B) de ratos PM, comparado com o grupo de ratos não-privados. Entretanto, o tratamento

com NAC, ácido fólico e ômega-3 reduziu os níveis de proteínas carbonil de ratos PM.

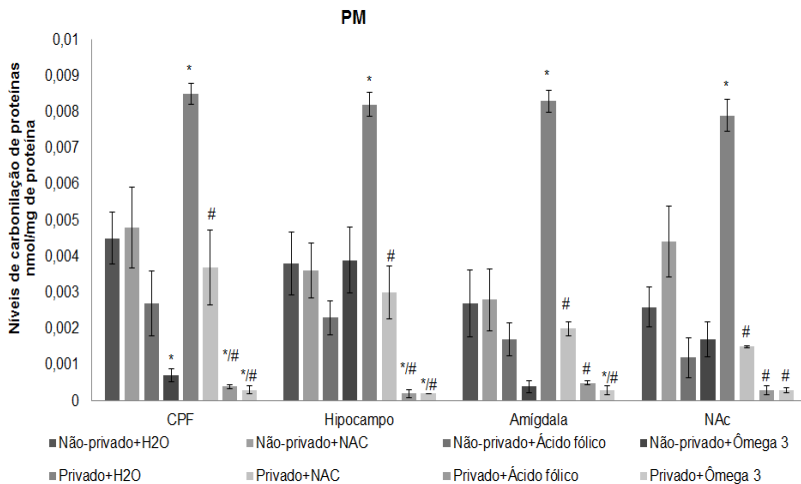


Figura 15B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre os níveis de carbonilação de proteínas no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A atividade da mieloperoxidase reduziu no CPF ( $F_{(7-43)} = 14,818$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15C), hipocampo ( $F_{(7-44)} = 9,599$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15C), amígdala ( $F_{(7-40)} = 12,871$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15C) e NAc ( $F_{(7-44)} = 24,961$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15C) de ratos privados e tratados com NAC, ácido fólico e ômega-3, comparado com ratos não-privados e privados tratados com água.

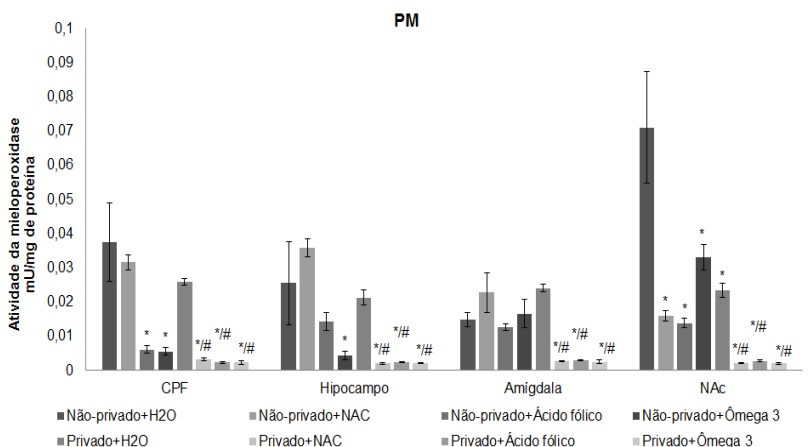


Figura 15C - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da mieloperoxidase no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Em ratos privados a concentração de nitrito/nitrato aumentou no CPF ( $F_{(7-44)} = 16,915$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15D), hipocampo ( $F_{(7-45)} = 30,256$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15D), amígdala ( $F_{(7-45)} = 9,112$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15D) e NAc ( $F_{(7-46)} = 10,482$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 15D). O tratamento com NAC, ácido fólico e ômega-3 reverteu as alterações induzidas pela PM na concentração de nitrito/nitrato no hipocampo, mas não no CPF, amígdala e NAc.

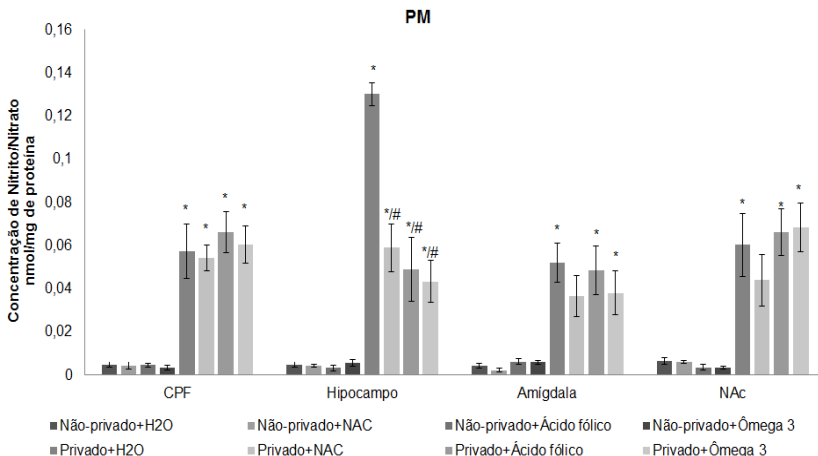


Figura 5D - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a concentração de nitrito/nitrato no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.12 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DE NAC, ÔMEGA-3 E ÁCIDO FÓLICO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NAS ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE PM

A atividade da SOD foi reduzida no CPF ( $F_{(7-45)} = 6,651$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 16A) e na amígdala ( $F_{(7-43)} = 9,390$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig.16A). Essas alterações foram revertidas após o tratamento com ômega-3 no CPF e após o tratamento com NAC e ômega-3 na amígdala. No hipocampo a atividade da SOD aumentou em ratos privados tratados com NAC, ácido fólico e ômega-3 ( $F_{(7-43)} = 8,394$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 16A). No NAc a atividade da SOD não foi alterada após a PM ou os tratamentos ( $F_{(7-43)} = 0,273$ ;  $p < 0,961$ ; Fig. 16A).



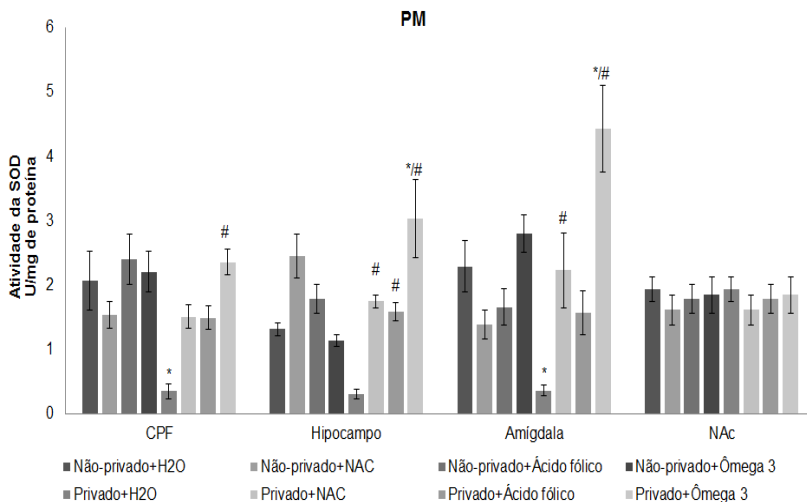


Figura 16A - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da SOD no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A atividade da CAT aumentou no CPF ( $F_{(7-44)} = 6,523$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 16B) e NAc ( $F_{(7-46)} = 8,706$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 16B) de ratos privados tratados com ômega-3, comparado com ratos não-privados e privados tratados com água. No hipocampo a atividade da CAT reduziu em ratos privados ( $F_{(7-45)} = 5,045$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 16B), comparado com ratos não-privados; porém, o tratamento com ácido fólico reverteu esta alteração no hipocampo. Na amígdala a atividade da CAT diminuiu nos ratos não privados tratados com NAC ( $F_{(7-43)} = 5,366$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 16B).

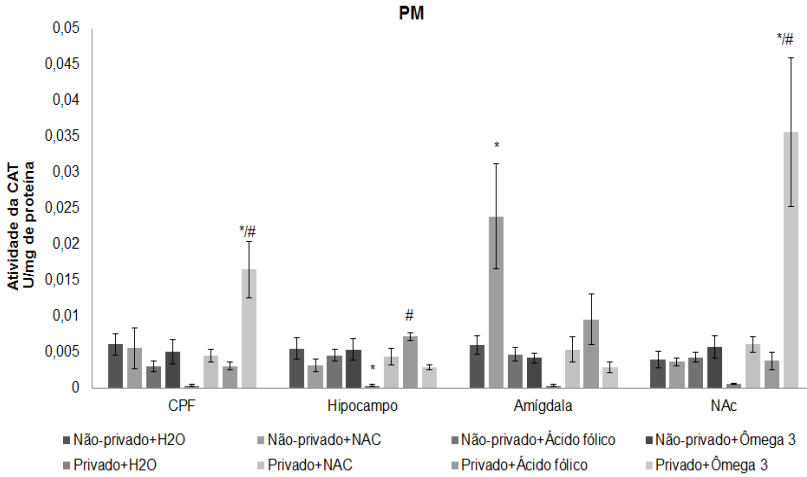


Figura 16B - Efeitos da administração de NAC, ômega-3 e ácido fólico sobre a atividade da CAT no CPF, amígdala, hipocampo e NAc em ratos submetidos ao protocolo de PM. As barras representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. controle + salina; # $p < 0,05$  vs. estresse + salina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

## 5 DISCUSSÃO

Evidências mostram que o estresse e o TDM estão frequentemente relacionados. De fato, eventos estressores durante a vida podem precipitar episódios depressivos em indivíduos vulneráveis (Kendler et al., 1999). A importância da interação da mãe com filhos tem sido discutida há muitos anos. Sabe-se que o estresse no início da vida pode ter um importante impacto no desenvolvimento do SNC (Ignácio et al., 2017). Além disso, o estresse durante a infância sob a forma de abuso ou negligência aumenta o risco de depressão na idade adulta (Pechtel e Pizzagalli, 2011). Em modelos animais de depressão, estudos mostram que o ECM induz a um comportamento depressivo em ratos como, a diminuição da ingestão de sacarose, acasalamento e motivação, e ainda, alterações no sono (Willner, 2005). Achados da literatura sugerem que o estresse pós-natal em ratos predispõe a um comportamento ansioso e depressivo na vida adulta (Morley-Fletcher et al., 2003; Lee et al., 2007).

No presente estudo foi demonstrado que ratos submetidos aos modelos animais de ECM e PM tiveram um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, mostrando um comportamento do tipo depressivo. No entanto, os ratos estressados tratados com cetamina e minociclina e os privados tratados com cetamina, minociclina e amitriptilina diminuíram o tempo de imobilidade, sugerindo um efeito antidepressivo desses tratamentos. Além disso, o tratamento com ácido fólico preveniu o comportamento do tipo depressivo induzido pela PM, e o tratamento com ômega-3 e ácido fólico preveniu o comportamento do tipo depressivo induzido pelo ECM. Estudos prévios mostraram que o ECM leva a um aumento no tempo de imobilidade e que este efeito foi atenuado pela administração aguda de cetamina (Ma et al., 2013; Wang et al., 2015). Além disso, pesquisas anteriores demonstraram que ratos privados tratados com uma única dose de cetamina também diminuíram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Réus et al., 2013a, 2015a, b). Em relação à minociclina e a amitriptilina, Liu e colaboradores (2015) e Sanna e colaboradores (2017) observaram que estes fármacos, respectivamente, foram capazes de atenuar o comportamento do tipo depressivo de ratos submetidos ao protocolo de ECM. Este é o primeiro estudo a mostrar os efeitos da minociclina e amitriptilina no tempo de imobilidade nos ratos submetidos ao modelo de PM. Com base nesses resultados, o presente estudo sugere que a administração de cetamina, minociclina e amitriptilina, exerce efeitos antidepressivos nos modelos animais de depressão.

No presente estudo foi demonstrado que o tratamento oral com ômega-3 e ácido fólico por 20 dias reduziu o tempo de imobilidade, comparado com ratos privados não tratados. Porém, em ratos submetidos ao ECM somente o tratamento com ácido fólico preveniu os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse. As diferenças encontradas no presente estudo podem ser relacionadas, pelo menos em parte, aos distintos efeitos causados pelos diferentes modelos animais de depressão. Shi e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com ômega-3 preveniu o comportamento do tipo depressivo e a neuroinflamação induzidos pelo LPS, um lipopolissacarídeo. Já o tratamento com ômega-3 por 7 dias não foi capaz de reverter o comportamento anedônico em ratos submetidos ao ECM (de Mello et al., 2014). Estudos experimentais mostraram que a administração de ácido fólico foi capaz de prevenir o comportamento do tipo depressivo induzido pela administração crônica de corticosterona (Rosa et al., 2014) e pelo estresse de contenção (Budni et al., 2013). A combinação de baixas doses de ácido fólico (10 mg/kg) com o antidepressivo venlafaxina (4 mg/kg) exerceu efeitos antidepressivos e reverteu o aumento nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (Thomas et al., 2016). Em pacientes com TDM o índice de ômega-3 foi negativamente associado com o TNF- $\alpha$  e da enzima óxido nítrico sintase (Baek e Park, 2013). Em uma meta-análise foi confirmado que baixos níveis de ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), as quais exercem as funções benéficas do ômega-3, foram associados com sintomas depressivos em pacientes com TDM (Lin et al., 2010).

Vários estudos já mostraram que a fisiopatologia do TDM pode estar relacionada com um aumento das EROs, as quais levam a danos oxidativos em várias áreas do cérebro envolvidas com a regulação do humor (Lucca et al., 2009b; Della et al., 2012; Abelaira et al., 2013b; Réus et al., 2014). Essa teoria é sustentada pelo fato de que o tratamento com antidepressivos são geralmente capazes de reverter estes efeitos em modelos animais de depressão (Della et al., 2012; Abelaira et al., 2013b; Réus et al., 2014). O cérebro é um órgão muito sensível as EROs, desde que há nele um alto consumo de oxigênio para manter a homeostase e funções cerebrais. O excesso de oxigênio utilizado pode resultar na produção de radicais livres, levando a um prejuízo nas funções cerebrais por um aumento no dano a lipídeos, proteínas e a deficiência na modulação de neurotransmissores, como a serotonina e o glutamato (Halliwell, 2006, 2010, 2011; Siwek et al., 2013).

O presente estudo mostrou que tanto o ECM quanto a PM levaram a um aumento dos níveis de MDA e carbonilação de proteínas,

no entanto, os tratamentos com cetamina, minociclina e amitriptilina foram capazes de reverter estes efeitos somente em algumas áreas cerebrais. Um estudo prévio mostrou que ratos submetidos ao protocolo de PM tiveram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas e que a administração de uma única dose de cetamina-S reverteu este dano (Réus et al., 2015a). Vasconcelos e colaboradores (2015) demonstraram que a administração crônica de cetamina levou a déficits de memória de trabalho e a danos oxidativos no CPF. Além disso, outro estudo relatou que os níveis de MDA e da proteína carbonil aumentaram no CPF, hipocampo e NAc, porém a administração crônica de minociclina foi capaz de diminuir esses danos em algumas áreas cerebrais (Réus et al., 2015c). Ainda, Bautista-Ferrufino e colaboradores (2011) mostraram que a administração de amitriptilina aumentou os níveis de MDA de forma dependente da dose em diferentes tecidos de ratos analisados, tais como fígado, pulmão, rim, cérebro, coração e músculo esquelético. Assim, os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos da administração de cetamina, minociclina e amitriptilina sobre os níveis de MDA e carbonilação de proteínas são dependentes da dose, tempo de administração, estrutura cerebral e do modelo animal utilizado.

Os altos níveis de MDA em ratos submetidos a PM foram revertidos pelo tratamento com NAC, ácido fólico e ômega-3. Porém, em ratos submetidos ao ECM os níveis de MDA foram reduzidos pelo ácido fólico e NAC no CPF e pelo ômega-3 e NAC no hipocampo. O tratamento com ômega-3 elevou os níveis de MDA no CPF e o ácido fólico elevou no hipocampo. Na amígdala e no NAc os tratamentos com ácido fólico, ômega-3 e NAC reverteram os efeitos do estresse nos níveis de MDA. Calzada e colaboradores (2010) revelaram que a suplementação com ômega-3 reduziu os níveis de MDA em homens saudáveis. Além disso, em indivíduos com ou sem MDD as concentrações de TBARS foram negativamente correlacionadas com níveis de ômega-3 em eritrócitos, mas positivamente associada com níveis de ômega-6 (Baek e Park, 2013), sugerindo-se que a suplementação com ômega-3 poderia ser uma boa alternativa para o tratamento do TDM. Os mecanismos pelos quais o ômega-3 exerce efeitos antioxidantes ainda não estão totalmente descritos, mas sugere-se que o DHA e o EPA formem micelas as quais combatem os radicais livres, reduzindo a produção de radicais superóxido e hidroxila (Giordano e Visioli, 2014). Uma pesquisa demonstrou que 12 semanas de tratamento com ômega-3 melhorou os sintomas depressivos em pacientes com doença coronária e esses efeitos foram associados com

uma diminuição na peroxidação lipídica (Mazereeuw et al., 2017). Uma inversa correlação do consumo de ômega-3 e a severidade dos sintomas depressivos foi encontrada em indivíduos com altas concentrações urinárias de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), um marcador de medida de estresse oxidativo (Bigornia et al., 2016).

Perez-Cornago e colaboradores (2014) demonstraram que um alto consumo de ácido fólico bem como uma redução nos níveis plasmáticos de MDA durante uma intervenção de perda de peso foi associado com uma melhora em sintomas depressivos. Os mecanismos envolvidos nos efeitos antidepressivos do ácido fólico podem ser relacionados com uma redução no metabolismo da homocisteína, já que níveis aumentados dessa se correlacionam um alto risco para piora no humor e uma deficiência de ácido fólico leva a um acúmulo de homocisteína (Qin et al., 2013). A homocisteína pode levar a excitotoxicidade em neurônios via ativação dos receptores NMDA e acúmulo de EROs (Boldyrev et al., 2013). Um estudo mostrou que os efeitos antidepressivos do ácido fólico são mediados em parte pela inibição do receptor NMDA (Brocardo et al., 2013), assim os efeitos antidepressivos do ácido fólico poderiam estar associados a uma redução da homocisteína, inibição do receptor NMDA e consequentemente diminuição do estresse oxidativo. Com relação aos efeitos do NAC, previamente também foi demonstrado que o NAC sozinho ou em combinação com desferoxamina reduziu o dano oxidativo em ratos submetidos ao ECM (Arent et al., 2012). Porém, esse é o primeiro estudo a demonstrar os efeitos antioxidantes do NAC em ratos submetidos a PM.

Em modelos animais de depressão níveis aumentados de carbonilação de proteínas já foram reportados (Lucca et al., 2009a; Zafir et al., 2009), os quais foram regulados após tratamento com antidepressivo (Della et al., 2012). No presente estudo foi também demonstrado um aumento nos níveis de carbonilação de proteína em cérebro de ratos submetidos a PM e ao ECM. Interessantemente, o tratamento com ácido fólico, ômega-3 e ômega-3 reduziram os níveis de proteína carbonil em todas as regiões cerebrais analisadas, sugerindo que os efeitos antidepressivos dessas terapias poderiam ser associados com uma diminuição no dano a proteínas.

O presente estudo também demonstrou que a atividade da mieloperoxidase foi aumentada no CPF, hipocampo e NAc. Porém, os tratamentos com cetamina e amitriptilina reverteram estes efeitos. Já no protocolo de PM, houve um aumento na atividade da mieloperoxidase no CPF e hipocampo, e ainda, os tratamentos com cetamina no CPF e cetamina, minociclina e amitriptilina na amígdala diminuíram esses

efeitos. O tratamento com NAC reduziu a atividade da mieloperoxidase na amígdala e o ácido fólico e ômega-3 reduziram a mieloperoxidase no núcleo accumbens de ratos submetidos ao ECM. Em ratos submetidos a PM a mieloperoxidase foi reduzida em ratos tratados com ácido fólico, ômega-3 e NAC, indicando que os efeitos antioxidantes desses tratamentos poderiam ser mediados pela redução da peroxidação lipídica via regulação da mieloperoxidase. De fato, altos níveis de mieloperoxidase foram correlacionados com peroxidação lipídica e sintomas depressivos em humanos (Vaccarino et al., 2008; Galecki et al., 2010). A enzima mieloperoxidase está presente nos neutrófilos, monócitos e células microgliais. Esta enzima está envolvida na peroxidação lipídica e catalisa a formação do ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio e cloreto (Spickett et al., 2000; Galecki et al., 2010). Ainda, além das EROs, a mieloperoxidase induz a uma produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas em doenças neurodegenerativas (Lefkowitz e Lefkowitz, 2008) e na perda da neurogênese no hipocampo (Ekdahl et al., 2003). Pesquisas mostraram que níveis altos da enzima mieloperoxidase foi relacionada com o TDM (Vaccarino et al., 2008). Observou-se uma correlação positiva entre o polimorfismo de um único nucleotídeo na região promotora do gene que codifica a enzima mieloperoxidase com a depressão recorrente (Vaccarino et al., 2008). Galecki e colaboradores (2010) também demonstraram que a variante polimórfica, que aumenta a expressão da mieloperoxidase, esta mais associada com o TDM. Este é o primeiro estudo a mostrar os efeitos da administração de cetamina, minociclina, amitriptilina, ômega-3, ácido fólico e NAC na atividade da mieloperoxidase em animais submetidos aos modelos animais de depressão.

Estudos têm demonstrado que a superprodução de espécies reativas ao nitrogênio resulta em processos oxidativos e inflamatórios, levando a neurotoxicidade (Sayre et al., 2008). De fato, achados na literatura já demonstraram que níveis aumentados de óxido nítrico e nitrito estão associados ao TDM (Maes et al., 2009). O presente estudo mostrou que tanto no protocolo de ECM quanto no de PM, houve um aumento na concentração de nitrito/nitrato e que os tratamentos com cetamina, minociclina, amitriptilina, NAC, ácido fólico e ômega-3 foram capazes de diminuir estes efeitos em algumas áreas cerebrais. Um estudo prévio mostrou que animais submetidos ao ECM tiveram um aumento no tempo de imobilidade e a concentração de nitrito/nitrato no hipocampo, amígdala e NAc, porém o tratamento com *Cecropia pachystachia*, uma planta enriquecida com flavonóides, reduziu a

imobilidade e reverteu o aumento do teor de nitrito/nitrato nestas regiões cerebrais (Ortmann et al., 2016). Em outro estudo com animais submetidos ao ECM, o aumento do óxido nítrico exerceu um efeito negativo na neurogênese do hipocampo e parece estar pelo menos em parte responsável pelo comportamento depressivo dos animais (Zhou Et al., 2007). Este é o primeiro estudo a mostrar os efeitos da administração de cetamina, minociclina, amitriptilina, NAC, ácido fólico e ômega-3 na concentração de nitrito/nitrato nos modelos animais de ECM e PM. Estes resultados sugerem que os efeitos de todos os tratamentos na concentração de nitrito/nitrato podem ser benéficos em algumas estruturas cerebrais, levando a um efeito neuroprotetor.

O sistema primário de defesa antioxidante envolve os efeitos coordenados de algumas enzimas, como a SOD e a CAT, já foram estudadas de forma consistente em indivíduos com TDM (Ng et al., 2008). Um fator importante é que a SOD é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, convertendo o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é convertido em água e oxigênio pelas enzimas CAT e glutathione peroxidase (Padurariu et al., 2010). Estudos já mostraram que em animais submetidos aos protocolos de ECM e PM, as atividades da SOD e da CAT encontram-se reduzidas nas regiões cerebrais relacionadas à regulação do humor, tais como CPF, hipocampo e NAc (Che et al., 2015; Liu et al 2015; Réus et al., 2015a; Ortmann et al., 2016). No entanto, o presente estudo mostrou que os protocolos de ECM e PM diminuíram a atividade da SOD e da CAT em algumas regiões cerebrais, e ainda, que só a minociclina e a amitriptilina foram capazes de reverter essa diminuição no protocolo de PM. Um estudo demonstrou que o tratamento com cetamina reduziu a atividade da SOD e da CAT no hipocampo, porém, o pré-tratamento com *Cecropia pachystachya*, ou com cloreto de lítio impediu os efeitos pro-oxidantes da cetamina (Gazal et al., 2014). Hou e colaboradores (2013) mostraram que a administração crônica de cetamina, em animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, foi capaz de aumentar o óxido nítrico no CPF, hipocampo e soro e diminuiu a atividade da SOD no hipocampo. No entanto, dependendo do tempo em que a cetamina é administrada, esta pode ter um efeito antioxidante. Como mostrado por Réus e colaboradores (2015d), a atividade da SOD foi aumentada nos animais controles que receberam cetamina por 14 dias no CPF e NAc e foi diminuída nos animais privados que receberam salina e cetamina. A discrepância dos resultados no presente estudo pode estar relacionada com a forma de como o modelo animal foi conduzido. Além disso, este é o primeiro estudo a mostrar os efeitos da minociclina e amitriptilina na



atividade das enzimas antioxidantes. Os achados do presente estudo também demonstraram que a atividade das enzimas SOD e CAT foram aumentadas com o tratamento de ácido fólico e ômega-3 em cérebro de ratos sujeitos ao estresse no início da vida ou tardio. Budni et al. (2013) demonstrou que o tratamento com ácido fólico restaurou o prejuízo em enzimas antioxidantes induzido pelo estresse de contenção. Além disso, uma dieta contendo ômega-3 foi capaz de restaurar as defesas antioxidantes enzimáticas de filhotes nascidos de ratas dislipidêmicas (Ramaiyan et al., 2016). No presente estudo, o tratamento com NAC não alterou as enzimas antioxidantes SOD e CAT em ratos submetidos a ECM. Previamente foi demonstrado que o tratamento com NAC combinado com desferal teve um efeito mais pronunciado em aumentar enzimas antioxidantes. A presente pesquisa sugere que os fármacos estudados possam exercer um efeito neuroprotetor em algumas regiões cerebrais através do aumento da atividade da SOD e da CAT em animais submetidos a modelos animais de depressão.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os resultados do presente estudo mostraram que a administração de cetamina, minociclina, amitriptilina, ômega-3 e ácido fólico foram capazes de exercer efeitos antidepressivos no teste do nado forçado. Porém, esses efeitos antidepressivos foram dependentes do modelo de estresse pelos quais os animais foram expostos. De forma geral os fármacos tiveram um melhor efeito quando os animais foram submetidos ao estresse no início da vida. Estratégias de prevenção, assim como de reversão, com propriedades antioxidantes parecem ser muito importantes para inibirem os efeitos comportamentais e alterações cerebrais decorrentes de um fator estressante.

Como o estresse oxidativo está fortemente relacionado com o TDM é importante ter cautela visto que alguns fármacos em determinadas regiões cerebrais apresentaram um efeito pró-oxidante. Porém, a maioria das estratégias usadas nesse estudo exerceram efeitos antioxidantes, como relatado pela diminuição do dano em proteínas, lipídeos, concentração de nitrito/nitrato e da atividade da MPO. Além disso, um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT também foi evidente após o tratamento com estratégias de prevenção e reversão, sugerindo que os efeitos antidepressivos da cetamina, minociclina, ômega-3 e ácido fólico, sejam pelo menos em parte, associados aos seus efeitos antioxidantes e neuroprotetores.

Por fim, estudos futuros que investiguem vias de sinalização envolvidas com a fisiopatologia do TDM em diferentes situações de estresse, bem como vias envolvidas com estresse oxidativo são de suma importância para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do TDM.

## REFERÊNCIAS

- Aan het Rot M, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ*. 2009; 180(3):305-13.
- Abelaira HM, Réus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr* 2013a; 35:112-20.
- Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Rosa DV, et al. Effects of lamotrigine on behavior, oxidative parameters and signaling cascades in rats exposed to the chronic mild stress model *Neurosci Res* 2013b; 75:324–330.
- Abou-Saleh MT, Coppen A. Folic acid and the treatment of depression. *J Psychosom Res* 2006; 61(3):285-287.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121–126.
- Alpert JE, Mischoulon D, Nierenberg AA, Fava M. Nutrition and depression: focus on folate. *Nutrition* 2000;16(7-8):544-546.
- American Psychiatric Association. *DSM-5: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed 2014; 992.
- Anderson IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord* 2000;58(1):19-36.
- Andrade PMM, Do Carmo MGT. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. *Metabólica* 2006; 8(3):135-143.
- Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci* 1998; 16(3-4):149-164.
- Arent CO1, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int* 2012;61:1072-1080.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989;6(6):593-597.
- Baek DI, Park Y. Association between erythrocyte n-3 polyunsaturated fatty acids and biomarkers of inflammation and oxidative stress in patients with and without depression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;89(5):291-296.

- Banaclocha MM. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses* 2001;56(4):472-477.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987; 32:279-312.
- Bautista-Ferrufino MR1, Cordero MD, Sánchez-Alcázar JA, Illanes M, Fernández-Rodríguez A, Navas P, de Miguel M. Amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative damage in mouse lung and liver. *Toxicol Lett.* 2011;204:32-37.
- Berk BC. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007; 118:209-214.
- Berk M, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Judd F, Katz F, Katz P, Ording-Jespersen S, Little J, Conus P, Cuenod M, Do KQ, Bush AI. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia--a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry* 2008;64(5):361-368.
- Berk M, Dean O, Cotton SM, Gama CS, Kapczinski F, Fernandes BS, Kohlmann K, Jeavons S, Hewitt K, Allwang C, Cobb H, Bush AI, Schapkaitz I, Dodd S, Malhi GS. The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. *J Affect Disord* 2011;135(1-3):389-394.
- Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 137-151.
- Bigornia SJ1, Harris WS2, Falcón LM3, Ordovás JM4, Lai CQ3, Tucker KL5. The Omega-3 Index Is Inversely Associated with Depressive Symptoms among Individuals with Elevated Oxidative Stress Biomarkers. *J Nutr* 2016;146:758-766.
- Boldyrev A, Bryushkova E, Mashkina A, Vladychenskaya E. Why is homocysteine toxic for the nervous and immune systems? *Curr Aging Sci* 2013;6: 29-36.
- Brocardo Pde S1, Budni J, Lobato KR, Kaster MP, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol* 2008;598:37-42.
- Brunello N, Mendlewicz J, Kasper S, Leonard B, Montgomery S, Nelson J, Paykel E, Versiani M, Racagni G. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12(5):461-475.
- Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, dos Santos AA, Moretti M, et al. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal

antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol* 2013;240:112–121.

Calzada CI, Colas R, Guillot N, Guichardant M, Laville M, Véricel E, Lagarde M. Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis* 2010;208:467-472.

Casey BJ, Somerville LH, Gotlib IH, Ayduk O, Franklin NT, Askren MK, Glover G. Behavioral and neural correlates of delay of gratification 40 years later. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108(36), 14998-1.

Che Y, Zhou Z, Shu Y, Zhai C, Zhu Y, Gong S, Cui Y, Wang JF. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci Lett* 2015; 584:208–213.

Coppen A, Bailey J. Enhancement of the antidepressant action of fluoxetine by folic acid: a randomised, placebo controlled trial. *J Affect Disord* 2000;60(2):121-130.

Coppen A, Swade C, Jones SA, Armstrong RA, Blair JA, Leeming RJ. Depression and tetrahydrobiopterin: the folate connection. *J Affect Disord*. 1989;16(2-3):103-107.

Coppen A1, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol* 2005;19(1):59-65.

Cortes ML, Castro MMC, de Jesus RP, Neto JAB, Kraychete DC. Uso de terapêutica com ácidos graxos ômega-3 em pacientes com dor crônica e sintomas ansiosos e depressivos. *Rev Dor* 2013;14(1):48-51.

Cuijpers P, Smit F. Excess mortality in depression: a meta-analysis of community studies. *J Affect Disord* 2002; 72 (3): 227-236.

De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med* 1991;91(3C):122S-130S.

De Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29(2):271-281.

de Mello AH1, Gassenferth A, Schraiber Rde B, Souza Lda R, Florentino D, Danielski LG, Cittadin-Soares Eda C, Fortunato JJ, Petronilho F, Quevedo J, Rezin GT. Effects of omega-3 on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to chronic mildstress. *Metab Brain Dis* 2014;29(3):691-699.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally

- separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 1989; 26: 335-341.
- Della FP, Abelaira HM, Réus GZ, Antunes AR, Dos Santos MA, Zappelinni G, et al. Tianeptine exerts neuroprotective effects in the brain tissue of rats exposed to the chronic stress model *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 10:395–402.
- Domercq M, Matute C. Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(12):609-612.
- Drzyzga R, Marcinowska A, Obuchowicz E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull* 2009; 79: 248-257.
- Dumam RS, Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. *Biological Psychiatry* 1998;44:324-333.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13632-13637.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186:407–421.
- Fava M, Borus JS, Alpert JE, Nierenberg AA, Rosenbaum JF, Bottiglieri T. Folate, vitamin B12, and homocysteine in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 1997;154(3):426-428.
- Ferrari G, Yan CY, Greene LA. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci*. 1995;15(4):2857-66.
- Ferreira FR, Biojone C, Joca SR, Guimarães FS. Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. *Behav Pharmacol* 2008;19(7):747-750.
- Finkel T1, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239-247.
- Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):236-245.
- Fortunato JJ, Réus GZ, Kirsch TR, Stringari RB, Fries GR, Kapczinski F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J. *Brain Res Bull* 2010 Mar 16;81(4-5):491-496.
- Gałecki P, Florkowski A, Bobińska K, Śmigielski J, Bieńkiewicz M, Szemraj J. Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene (G-463A) in depressive patients. *Acta Neuropsychiatr* 2010; 22(5): 218-222.
- Gamaro GD, Streck EL, Matte C, Prediger ME, Wyse ATS, Dalmaz C. Reduction of hippocampal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase activity in rats subjected to

- an experimental model of depression. *Neurochem Res* 2003; 28:1339-1344.
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008a; 32(1):140-144.
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008b; 103(6):502-506.
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33(3):450-455.
- Gazal M, Valente MR, Acosta BA, Kaufmann FN, Braganhol E, Lencina CL, Stefanello FM, Ghisleni G, Kaster MP. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *Eur J Pharmacol* 2014;724:132-139.
- Giordano E, Visioli F. Long-chain omega 3 fatty acids: molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2014; 90: 1–4.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142(2):231-255.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634–1658.
- Halliwell B, Lee CY. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues. *Anti-oxid Redox Signal* 2010; 13:145–156.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32:125–130.
- Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 2009;61(2):105-123.

- Hoeffler CA, Klann, E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 2010; 33(2): 67-75.
- Holmans P, Weissman MM, Zubenko GS, Scheftner WA, Crowe RR, Depaulo JR. et al. Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report. *Am J Psychiatry* 2007; 164: 248-258.
- Hou Y, Zhang H, Xie G, Cao X, Zhao Y, Liu Y, Mao Z, Yang J, Wu C. Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 45:107-116.
- Ignácio ZM<sup>1,2</sup>, Réus GZ<sup>3</sup>, Abelaira HM<sup>1</sup>, de Moura AB<sup>1</sup>, de Souza TG<sup>1</sup>, Matos D<sup>1</sup>, Goldim MP<sup>4</sup>, Mathias K<sup>4</sup>, Garbossa L<sup>4</sup>, Petronilho F<sup>4</sup>, Quevedo J<sup>1,5,6,7</sup>. Acute and chronic treatment with quetiapine induces antidepressant-like behavior and exerts antioxidant effects in the rat brain. *Metab Brain Dis* 2017; in press.
- Ignácio ZM, Réus GZ, Quevedo J, Kalinichev M, Francis D. Maternal Deprivation. In *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, Elsevier 2017; ISBN 9780128093245
- Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C, Cook TD, Hariharan N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol* 2004;56(2):221-227.
- Keller MB, Lavori PW, Mueller TI, Endicott J, Coryell W, Hirschfeld RMA, Shea T. Time to recovery, chronicity and levels of psychopathology in major depression. A 5-year prospective follow up of 431 subjects. *Arch Gen Psychiatry* 1992; 49:809-881.
- Kendler KS<sup>1</sup>, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 1999;156:837-841.
- Khairova RA, Machado-Vieira R, Du J, Manji HK. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009. 12(4): 561-578.
- Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res* 2009;196(2):168-179.
- Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Sandi C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J Psychiatr Res* 2010; 44: 808-816.
- Lee PR<sup>1</sup>, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res* 2007;1156:152-167.



Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(5):726-731.

Levine J, Cholestoy A, Zimmerman J. Possible antidepressant effect of minocycline. *Am J Psychiatry* 1996;153(4):582.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186:464-478.

Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 2010; 329(5994):959-964.

Li Y, Xu S, Giles A, Nakamura K, Lee JW, Hou X, Donmez G, Li J, Luo Z, Walsh K, Guarente L, Zang M. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J* 2011; 25(5):1664-1679.

Lin PY1, Huang SY, Su KP. A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol Psychiatry* 2010;68:140-147.

Linck VM, Costa-Campos L, Pilz LK, Garcia CR, Elisabetsky E. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol* 2012;23(2):171-177.

Liu Y, Lan N, Ren J, Wu Y, Wang ST, Huang XF, Yu Y. Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59:1130-1142.

Liu YN1, Peng YL1, Liu L1, Wu TY1, Zhang Y1, Lian YJ1, Yang YY1, Kelley KW2, Jiang CL1, Wang YX1. TNF $\alpha$  mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur Cytokine Netw* 2015;26:15-25.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-275.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J Psychiatr Res* 2009a; 43(9): 864-869.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int* 2009b; 54:358-362.

- Ma XC1, Dang YH, Jia M, Ma R, Wang F, Wu J, Gao CG, Hashimoto K. Long-lasting antidepressant action of ketamine, but not glycogen synthase kinase-3 inhibitor SB216763, in the chronic mild stress model of mice. *PLoS One* 2013;8:e56053.
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35(3):676–692.
- Magalhães PV, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Berk M. N-acetyl cysteine add-on treatment for bipolar II disorder: a subgroup analysis of a randomized placebo-controlled trial. *J Affect Disord* 2011;129(1-3):317-320.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nature Medicine*. 2001;7 (5), 541–547.
- Marazita ML, Neiswanger K, Cooper M, Zubenko GS, Giles DE, Frank, E, Kupfer DJ, Kaplan BB. Genetic segregation analysis of early-onset recurrent unipolar depression. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1370-1378.
- Mazereeuw G1, Herrmann N2, Andreatza AC3, Scola G4, Ma DW5, Oh PI6, Lanctôt KL7. Oxidative stress predicts depressive symptom changes with omega-3 fatty acid treatment in coronary artery disease patients. *Brain Behav Immun* 2017;60:136-141.
- McDermott LM, Ebmeier KP. A meta-analysis of depression severity and cognitive function. *J Affect Disord* 2009; 119(1-3):1–8.
- McGonigle, P. Animal models of CNS disorders. *Biochem Pharmacol* 2014; 87:140-149.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 2009; 65(9): 732–741.
- Molina-Hernandez M, Tellez-Alcantara NP, Perez-Garcia J, Olivera-Lopez JI, Jaramillo-Jaimes MT. Antidepressant-like actions of minocycline combined with several glutamate antagonists. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32(2):380–386.
- Morley-Fletcher S1, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci* 2003;18:3367-3374.
- Morris DW, Trivedi MH, Rush AJ. Folate and unipolar depression. *J Altern Complement Med* 2008;14(3):277-285.
- Mössner R , Mikova O , Koutsilieri E , Saoud M , Ehli AC , Müller N , Fallgatter AJ , Riederer P . Consensus paper of the WFSBP Task

Force on Biological Markers: biological markers in depression. *World J Biol Psychiatry* 2007; 8(3): 141–174.

Mueller TI, Leon AC, Keller MB, Solomon DA, Endicott J, Coryell W, Warshaw M, Maser JD. Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 1000-1006.

Nemeroff CB, Owens MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci* 2002; 5: 1068-1070.

Nemeroff CB. Paradise Lost: The Neurobiological and Clinical Consequences of Child Abuse and Neglect. *Neuron* 2016; 89(5): 892-909.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002;34(1):13-25.

Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry* 2002; 52(6): 503-528.

Ng F1, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:851-876.

O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Moreau M, Lestage J, Castanon N. Lipopoly saccharide induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 2009; 14(5):511–522.

Ortmann CF, Réus GZ, Ignácio ZM, Abelaira HM, Titus SE, de Carvalho P, Arent CO, Dos Santos MA, Matias BI, Martins MM, de Campos AM, Petronilho F, Teixeira LJ, Morais MO, Streck EL, Quevedo J, Reginatto FH. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. *Neurotox Res* 2016; 29(4): 469-483.

Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett* 2010; 479:317–320.

Pae CU, Marks DM, Han C, Patkar AA. Does minocycline have antidepressant effect? *Biomed Pharmacother* 2008; 62(5):308–311.

Pechtel P1, Pizzagalli DA. Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;214:55-70.

- Perez-Cornago A1, Lopez-Legarrea P2, de la Iglesia R3, Lahortiga F4, Martinez JA5, Zulet MA6. Longitudinal relationship of diet and oxidative stress with depressive symptoms in patients with metabolic syndrome after following a weight loss treatment: the RESMENA project. *Clin Nutr* 2014;33:1061-1067.
- Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Ann Med* 2010;42:252-264
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther Archives* 1977; 229: 327-336.
- Qin X, Huo Y, Xie D, Hou F, Xu X, Wang X. Homocysteine-lowering therapy with folic acid is effective in cardiovascular disease prevention in patients with kidney disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* 2013;32:722e7.
- Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: Inflammation and the pathogenesis of major depression. *Trends Immunol* 2006; 27(1): 24–31.
- Ramaiyan B1, Bettadahalli S1, Talahalli RR2. Dietary omega-3 but not omega-6 fatty acids down-regulate maternal dyslipidemia induced oxidative stress: A three generation study in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;477:887-894.
- Reed DJ, Fariss MW. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev* 1984;36(2):25S-33S.
- Réus GZ1, Stringari RB, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3(5): 325-331.
- Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Ferraro AK, Vitto MF, Cesconetto P, Souza CT, Quevedo J. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. *Behav Brain Res* 2011; 221(1):166-171.
- Réus GZ, Dos Santos MA, Abelaira HM, Ribeiro KF, Petronilho F, Vuolo F, Colpo GD, Pfaffenseller B, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. *Behav Brain Res* 2013a; 242:40-46
- Réus GZ, Abelaira HM, dos Santos MA, Carlessi AS, Tomaz DB, Neotti MV, Lirango JL, Gubert C, Barth M, Kapczinski F, Quevedo J. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone

deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res* 2013b; 256:451-456.

Réus GZ, Vieira FG, Abelaira HM, Michels M, Tomaz DB, dos Santos MA, et al. MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine *J Psychiatr Res* 2014; 55:15–21.

Réus GZ1,2, Carlessi AS1, Titus SE2, Abelaira HM1, Ignácio ZM1, da Luz JR1, Matias BI1, Bruchchen L1, Florentino D3, Vieira A3, Petronilho F2,3, Quevedo J1,2. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol* 2015a;75(11):1268-1281.

Réus GZ1, Nacif MP2, Abelaira HM2, Tomaz DB2, dos Santos MA2, Carlessi AS2, da Luz JR3, Gonçalves RC4, Vuolo F4, Dal-Pizzol F4, Carvalho AF5, Quevedo J6. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett* 2015b;584:83-87.

Réus GZ1, Abelaira HM, Maciel AL, Dos Santos MA, Carlessi AS, Steckert AV, Ferreira GK, De Prá SD, Streck EL, Macêdo DS, Quevedo J. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. *Metab Brain Dis* 2015c;30(2):545-553.

Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, dos Santos MA, Carlessi AS, Matias BI, da Luz JR, Steckert AV, Jeremias GC, Scaini G, Morais MO, Streck EL, Quevedo J. Ketamine treatment partly reverses alterations in brain derived- neurotrophic factor, oxidative stress and energy metabolism parameters induced by an animal model of depression. *Curr Neurovasc Res* 2015d; 12:73-84.

Rousseau G. Depression's forgotten genealogy: notes towards a history of depression. *Hist Psychiatry* 2000;11:771-106.

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(5): 426-437.

Sanna MD1, Ghelardini C2, Galeotti N2. Effect of amitriptyline treatment on neurofilament-H protein in an experimental model of depression. *Brain Res Bull* 2017;128:1-6.

Santello M, Volterra A. TNF $\alpha$  in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci* 2012; 35(10): 638–647.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21:172-188.

Schiepers JO, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29(2): 201–217.

- Shi Z1, Ren H1, Huang Z1, Peng Y1, He B2, Yao X3, Yuan TF4, Su H5. Fish Oil Prevents Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior by Inhibiting Neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 2016; in press.
- Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Styczeń K, Szewczyk B, Kotarska K, Misztak P, Pilc A, Wolak M, Nowak G. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep* 2013;65:1558-1571
- Smaga I, Pomierny B, Krzyżanowska W, Pomierny-Chamióło L, Miszkiewicz J, Niedzielska E, Ogórka A, Filip M. N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;39(2):280-287.
- Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszyńska T, Schaur RJ. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* 2000; 47:889-899.
- Stahl SM, Grady MM. Differences in mechanism of action between current and future antidepressants. *J Clin Psychiatry* 2003;13:13-17.
- Su KP. Biological mechanism of antidepressant effect of omega-3 fatty acids: how does fish oil act as a 'mind-body interface'? *Neurosignals* 2009;17(2):144-1/52.
- Swenne I, Rosling A, Tengblad S, et al. Omega-3 polyunsaturated essential fatty acids are associated with depression in adolescents with eating disorders and weight loss. *Acta Paediatrica* 2011;100(12):1610-5.
- Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002; 159(12):2099-101.
- Traynor BJ, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology* 2006; 67(1):20-7.
- Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M; STAR\*D Study Team. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 2006;163(1):28-40.
- Tuglu C, Kara SH, Caliyurt O, Vardar E, Abayee. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. *Psychopharmacology* 2003; 170:429-33.
- Vaccarino V, Brennan ML, Miller AH, Bremner JD, Ritchie JC, Lindau F, Veledar E, Su S, Murrain NV, Jones L, Jawed F, Dai J, Goldberg J,

- Hazen SL. Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study. *Biol Psychiatry* 2008; 64(6): 476-83.
- Vasconcelos GS, Ximenes NC, de Sousa CN, Oliveira TQ, Lima LL, de Lucena DF, et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitregeric and neurotrophic mechanisms. *Schizophr Res* 2015; S0920-9964:00190-5.
- Vismari, L. et al. Depression, antidepressants and immune system: a new look to an old problem. *Arch. Clin. Psychiatry (São Paulo)*, v. 35, n. 5, p. 196-204, 2008.
- Wang N1, Yu HY2, Shen XF1, Gao ZQ2, Yang C2, Yang JJ3, Zhang GF3. The rapid antidepressant effect of ketamine in rats is associated with down-regulation of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus. *Ups J Med Sci* 2015;120:241-8.
- Weissman MM, Wickramaratne P, Nomura Y, Turner V, Pilowsky D, Verdelli H. Offspring of depressed parents: 20 years later. *Am J Psychiatry* 2006; 163: 1001-1008.
- Weissman MM, Wickramaratne P, Nomura Y, Warner V, Verdelli H, Pilowsky DJ, Grillon C, Bruder G. Families at high and low risk for depression: a 3-generation study. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62: 29-36.
- Whyte IM, Francis B, Dawson AH. Safety and efficacy of intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen overdose: analysis of the Hunter Area Toxicology Service (HATS) database. *Curr Med Res Opin* 2007;23(10):2359-68.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 134(4):319-29.
- Willner P1. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 2005;52:90-110.
- World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: WHO; 2008.
- Xiong Y, Peterson PL, Lee CP. Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1999;16(11):1067-82.
- Zafir A, Ara A, Banu N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33:220-228.
- Zarate CA, Manji HK. The role of AMPA receptor modulation in the treatment of neuropsychiatric diseases. *Exp Neurol* 2008; 211(1): 7-10.

Zemdegs JCS, Pimentel GD, Priel MR. Ácidos graxos ômega 3 e tratamento da esquizofrenia. *Rev Psiq Clín* 2010;37(5):223-7.

Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 2007; 103(5): 1843-54.



**ANEXO**

## ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Investigação De Novas Estratégias Para Prevenção E Tratamento Da Depressão”, Protocolo nº 021/2016-1 sob a responsabilidade de Josiane Budni, equipe: Amanda Luiz Maciel, Helena M. Abelaira, Maria Augusta B. Santos, Zuleide Maria Ignácio, Danyela Matos, Julia Possamai Demo, Julia Bardini, Airam Barbosa de Moura, Gislaine Z. Réus, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 111.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	Abril/2016 – dezembro/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº. De animais	640
Peso/Idade	250 a350g / 60 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

**Protocol number:** 021/2016-1


**Principal Investigator:** Josiane Budni

**Researchers:** Amanda Luiz Maciel, Helena M. Abelaira, Maria Augusta B. Santos, Zuleide Maria Ignácio, Danyela Matos, Julia Possamai Demo, Julia Bardini, Airam Barbosa de Moura, Gislaine Z. Réus.

**Project title:** “Investigation Of New Strategies For Prevention And Treatment Of Depression”.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 22 de março de 2016.

  
JAIRO JOSÉ ZOCHE  
Coordenador da CEUA