



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Anicet Okinga

Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico do caroço da *Euterpe oleracea* Mart. (açai) em modelo experimental de depressão

Rio de Janeiro

2018

Anicet Okinga

**Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico do caroço da *Euterpe oleracea*
Mart. (açai) em modelo experimental de depressão**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor ao
Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Ângela de Castro Resende

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O41 Okinga, Anicet.

Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico do caroço da *Euterpe oleracea* Mart. (açai) em modelo experimental de depressão / Anicet Okinga. – 2018.
154 f.

Orientador: Profa. Dra. Ângela de Castro Resende
Coorientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Açai – Teses. 2. Depressão – Teses. 3. Antidepressivos. 4. Fluoxetina. 5. Comportamento. 6. Plantas medicinais – Uso terapêutico. 7. Rato como animal de laboratório – Teses. 8. Euterpe. I. Resende, Ângela de Castro. II. de Moura, Roberto Soares. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 582.521.11

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7/5302

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Anicet Okinga

**Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da *Euterpe oleracea* Mart. (açai)
em modelo experimental de depressão**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor ao
Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Aprovada em 29 de junho de 2018

Coorientador:

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dra. Ângela de Castro Resende (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Marcos R. Ferraz
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Claudio C. Filgueiras
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dra. Mabel C. Fraga
Universidade Redentor

Prof. Dra. Julia Helena Rosauo Clarke
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTO

À Profa. Dra. Ângela de Castro Resende, minha orientadora, pela paciência, pelo exemplo, pela competência, dedicação e apoio.

À toda a Equipe da Farmacologia Cardiovascular e Plantas Mediciniais (Crisinteligente, Lenise, Dayane, Iza (a Bella), Lúcia, Viviane, Ricardinho, Jéssica, Daphne, Júlia, Mateus (es)....).

Aos amigos de trabalho diário no laboratório, (Jemima, Ana Paula, Mariana a bioterista) pois sem vocês não seria possível.

A Grazi, o milagre que eu não esperava, obrigado por compartilhar esse doutorado comigo!

À minha Esposa: EU TE AMO, BI! DEMAIS NÃO BASTA PARA LHE DIZER QUE EU TE AMO DEMAIS. Você é a chave do meu sucesso. Muito obrigado, minha esposa e irmã.

À minha filha Sophie e ao meu filho Bento: muito obrigado pelo seu amor tão puro, eu me sinto o pai mais bonito do mundo!

À minha família do Brasil (Lucimary, Dona Zita, Sr. Paulo, Caio, Iara, Mundinho, Júlia, Paulinho filho e neto, à Gabi, Pedro, Alessandra, meu amigo Laerte, ao Paulo, amigo e irmão), muito obrigado pelo seu incentivo de sempre.

À minha família do Gabão (Papa, mamã, Gisele, Blandine, Béatrice, Cosette e todos os meus sobrinhos e sobrinhas), agradeço por sempre acreditar e mim.

Aos meus irmãos e irmãs em CRISTO, amigos e companheiros nesse mundo (Fernando, Roney, Ana Maria, Andreza, Claudette, cito novamente Martinha, Iara, Lucimary, Gabi, Kátia, João Pedro e outros), eu vos amo no amor de Cristo e agradeço por sempre orar a Deus por mim.

Ao professor Roberto Soares de Moura, gostaria de dizer que eu o admiro e espero poder levar comigo as virtudes que aprendi desse grande e ilustre professor.

A Deus, a Cristo, ao Filho de Deus, ao Eterno, àquele que vive por si Só, a Ele, o Criador de tudo e de todos, a Ele toda a Honra, toda a Glória, todo Louvor para todo O sempre. Amém!

RESUMO

OKINGA, Anicet. *Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico do caroço da Euterpe oleracea Mart. (açai) em modelo experimental de depressão*. 2018. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão afeta cerca de 20% da população mundial. Evidências do nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcoólico do caroço da *Euterpe oleracea* Mart. (açai) (ASE), rico em polifenóis, promove efeitos anti-hipertensivo, antioxidante e vasodilatador. O objetivo desse trabalho foi investigar o potencial antidepressivo do ASE comparando-o com a fluoxetina (FLU), um fármaco inibidor seletivo da recaptação de serotonina com efeitos antidepressivos bem estabelecidos. Ratas Wistar foram colocadas para acasalar e após o nascimento, os filhotes machos foram separados em nove grupos experimentais: controle (CON; água), CON+ASE (200mg/kg/dia), CON+FLU (20 mg/Kg/dia); separação materna crônica (SMC; água), SMC+ASE (200 mg/Kg/dia), SMC+FLU (20 mg/Kg/dia); separação materna única (SMU; água), SMU+ASE (200 mg/Kg/dia) e SMU+FLU (20 mg/Kg/dia). O protocolo de SMC teve início no segundo dia pós-natal (PN2), os filhotes foram separados da mãe por 3 h durante 14 dias. O protocolo de SMU também teve início no dia PN2 e os filhotes foram separados da mãe por 8 minutos, apenas uma vez. A partir do dia PN76, os grupos tratados receberam ASE ou fluoxetina por gavagem intragástrica. Foram realizados os testes comportamentais de Porsolt e campo aberto. Após a eutanásia, os animais tiveram o sangue coletado para detecção das concentrações plasmáticas de CRH e GR; as glândulas adrenais retiradas para detecção das monoaminas dopamina (DA) e norepinefrina (NE), e em homogenato do hipotálamo foi realizada a quantificação do TrkB por ELISA. A expressão proteica de GR, PDE5, PPAR γ , pró-BDNF e BDNF foi realizada por *western blotting* em homogenato de hipotálamo e de hipocampo. As análises de dano oxidativo e de atividade enzimática foram realizadas por espectrofotometria em homogenato de tronco encefálico. Em relação aos grupos que não foram submetidos à separação materna, os tratamentos com ASE e FLU reduziram o tempo de imobilidade e a expressão do GR no hipotálamo. O ASE reduziu os níveis de CRH, e aumentou os níveis de NE, DA e de TRKB. Por outro lado, a FLU aumentou os níveis de CRH, e reduziu os níveis de DA e TRKB, ocasionando ainda dano oxidativo, e redução da atividade da GPx e dos níveis de nitrito. Os grupos SMC e SMU apresentaram aumento do dano oxidativo, redução da atividade antioxidante, assim como menor expressão de BDNF, GR, PDE5 e PPAR γ . Os tratamentos com ASE e com FLU reduziram o dano oxidativo, os níveis de CRH, e aumentaram os níveis de DA, de nitrito e a atividade antioxidante em animais submetidos a separação materna. Somente o ASE foi capaz de aumentar a expressão de PPAR γ e do GR, assim como de elevar os níveis de TRKB em animais deprimidos. O tratamento com FLU diferente do ASE aumentou a expressão de BDNF. Nossos resultados indicam que o ASE reduziu os efeitos deletérios da separação materna, através do seu efeito antioxidante, da redução da ativação do eixo HPA, do aumento de neurotransmissores e de proteínas essenciais para a neuromodulação negativa da depressão, demonstrando potencial antidepressivo.

Palavras-chaves: *Euterpe Oleracea* Mart.; Depressão; Separação materna;

Fluoxetina

ABSTRACT

OKINGA, Anicet. *Evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of Euterpe oleracea Mart. (açai) in an experimental model of depression*. 2018. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The World Health Organization (WHO) demonstrated that depression affects about 20% of the world's population. Evidence from our group showed that the hydroalcoholic extract of *Euterpe oleracea* Mart. (ASE), rich in polyphenols, has an antihypertensive, antioxidant and vasodilator effects. The aim of the study was to investigate the antidepressant potential of ASE by comparing it with fluoxetine (FLU), a selective serotonin reuptake inhibitor with well-established antidepressant effects. Female Wistar rats were placed to mate, and after birth the male offspring were separated into nine experimental groups: control (CON, water), CON + ASE (200mg / kg / day), CON + FLU (20mg / kg / day); chronic maternal separation (SMC, water); SMC + ASE (200 mg / kg / day), SMC + FLU (20 mg / kg / day); single maternal separation (SMU, water), SMU + ASE (200 mg / kg / day) and SMU + FLU (20 mg / kg / day). The SMC protocol started on the second post-natal day (PN2), the pups were separated from their mothers during 3 hours for 14 days. The SMU protocol also started on day PN2 and the pups were separated from their mothers for 8 minutes, only once. From day PN76, treated groups received ASE or fluoxetine by intragastric gavage. Porsolt and open field behavioral tests were performed. After euthanasia, the animals' blood was collected for the detection of CRH and GR plasma levels; the adrenal glands were removed for the detection of the monoamines dopamine (DA) and norepinephrine (NE), and in the homogenate of the hypothalamus was quantified the TrkB by ELISA. The protein expression of GR, PDE5, PPAR γ , pro-BDNF and BDNF was performed by western blotting on the hypothalamus and hippocampal homogenates. The analysis of oxidative damage and enzymatic activity were performed by spectrophotometry in brainstem homogenate. For the groups that were not submitted to maternal separation, the ASE and FLU treatments reduced the immobility time and the GR expression in the hypothalamus. ASE reduced CRH levels, and increased NE, DA, and TRKB levels. However, FLU increased CRH levels and reduced DA and TRKB levels, elevated oxidative damage, and reduced GPx activity and nitrite levels. The SMC and SMU groups showed increased oxidative damage, reduced antioxidant activity, as well as lower expression of BDNF, GR, PDE5, and PPAR γ . ASE and FLU treatments reduced oxidative damage, CRH levels, and increased levels of DA, nitrite and antioxidant activity in animals submitted to maternal separation. Only the ASE was able to increase the expression of PPAR γ and GR, as well as to enhance the levels of TRKB in depressed animals. The FLU treatment, unlike the ASE, increased BDNF expression. Our results indicate that ASE reduced the deleterious effects of maternal separation through its antioxidant effect, reduced HPA axis activation, increased neurotransmitters and proteins essential for negative neuromodulation of depression, demonstrating antidepressant potential.

Keywords: *Euterpe Oleracea* Mart.; Depression; Maternal separation; Fluoxetine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação entre o eixo HPA e a depressão (Regulação do eixo HPA.....	23
Figura 2 - Uma visão geral das principais moléculas neuroprotetoras e neurotóxicas envolvidas na neuroplasticidade induzida por fármacos.....	29
Figura 3 - Inibição das PDEs.....	31
Figura 4 - relação (Glutamato, sistema cAMP/cGMP, PDE, estresse oxidativo, monoaminas.....	36
Figura 5 - Ação catalisadora das enzimas antioxidantes.....	38
Figura 6 - Locais de ação dos antidepressivos.....	42
Figura 7 - Ilustrações da <i>Euterpe Oleracea</i> Mart.....	46
Figura 8 - Representação da análise do ASE por HPL.....	47
Figura 9 - Fotos representando as etapas do processo do ASE.....	52
Figura 10 - Vista lateral do teste de Porsolt	56
Figura 11 - Vista superior do campo aberto.....	56
Figura 12 - Tempo de imobilidade em teste de PORSOLT em animais não separados tratados com ASE e com Fluoxeina.....	65
Figura 13 - Tempo de imobilidade em teste de PORSOLT em animais submetidos à SMC tratados com ASE e com Fluoxeina.....	66
Figura 14 - Tempo de imobilidade em teste de PORSOLT em animais submetidos à SMU tratados com ASE e com fluoxetina.....	68
Figura 15 – Atividade locomotora em teste de campo aberto em animais não separados tratados com ASE e fluoxetina.....	69
Figura 16 - Atividade locomotora em teste de campo aberto em animais submetidos à SMC tratados com ASE e fluoxetina.....	71
Figura 17 - Atividade locomotora em teste de campo aberto em animais submetidos à SMU tratados com ASE e fluoxetina.....	72
Figura 18 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos não separados	73
Figura 19 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos submetidos à SMC.....	74
Figura 20 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos submetidos à SMU.....	75

Figura 21 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos não separados.....	76
Figura 22 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos submetidos à SMC.....	77
Figura 23 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos submetidos à SMU.....	78
Figura 24 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de receptor TrkB em ratos não separados.....	79
Figura 25 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de receptor TRkB em ratos submetidos a SMC.....	80
Figura 26 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de receptor TRkB em ratos submetidos a SMU.....	81
Figura 27 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos não separados.....	82
Figura 28 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a SMC.....	84
Figura 29 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a SMU.....	85
Figura 30 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do receptor GR em ratos não separados.....	86
Figura 31 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do receptor GR em ratos submetidos a SMC.....	88
Figura 32 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do receptor GR em ratos submetidos a SMU.....	89
Figura 33 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão da enzima PDE5 em ratos não separados.....	90
Figura 34 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão da enzima PDE5 em ratos submetidos a SMC.....	92
Figura 35 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão da enzima PDE5 em ratos submetidos a SMU.....	93
Figura 36 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do receptor PPAR γ em ratos não separados.....	94

Figura 37 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do receptor PPAR γ em ratos submetidos a SMC.....	96
Figura 38 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a expressão do receptor PPAR γ em ratos submetidos a SMU.....	97
Figura 39 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de MDA em ratos não separados, separados por SMC e SMU.....	99
Figura 40 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a carbonilação de proteínas em ratos não separados, separados por SMC e SMU....	101
Figura 41 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre a atividade da SOD em ratos não separados, separados por SMC e.....	103
Figura 42 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os a atividade da catalase em ratos não separados, separados por SMC e SMU.....	105
Figura 43 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os a atividade da GPx em ratos não separados, separados por SMC e SMU.....	107
Figura 44 - Efeito do tratamento com ASE e fluoxetina sobre os níveis de nitrito em ratos não separados, separados por SMC e SMU.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito de GRUPO no “tempo de imobilidade” em ratos não separados	64
Tabela 2 - Efeito de GRUPO no “tempo de imobilidade” em ratos da SMC	66
Tabela 3 - Efeito de GRUPO no “tempo de imobilidade” em ratos da SMU	67
Tabela 4 - Efeito de GRUPO na “atividade locomotora” em ratos não separados	69
Tabela 5 - Efeito de GRUPO na “atividade locomotora” em ratos da SMC	70
Tabela 6 - Efeito de GRUPO na “atividade locomotora” em ratos da SMU.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT1A	Receptor de serotonina tipo 1 A
5-HT1B	Receptor de serotonina tipo 1 B
5-HT1C	Receptor de serotonina tipo 1 C
5-HT2	Receptor de serotonina tipo 2
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
ANOVA	Análise de variância
APA	<i>American Psychiatry Association</i>
TrkB	Receptor quinase relacionados a tropomiosina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
CID.10	Classificação Internacional de Doenças, 10a. Revisão
CON	Grupo controle
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell Lymphoma-extra large
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
Akt	Proteína quinase serina/treonina (proteína quinase B)
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
PDE	Fosfodiesterase
PI-3K	Inositol 3-fosfato kinase
cAMP	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
cGMP	Guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina 3', 5'-trifosfato
GTP	Guanosina 3', 5'-trifosfato
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao Camp
SRF	Fator de resposta sérica
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores do peroxissoma
ERRO	Espécies oxidativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
NO	Óxido nítrico

ONOO ⁻	Peroxinitrito
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
SOD	Superóxido dismutase
GPx	Glutathiona peroxidase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
CAT	Catalase
TNF	Teste de nado forçado
TCA	Teste de campo aberto
Bcl-2	promotor de morte celular associado a Bcl-xL/Bcl-2
DA	Dopamina
DSM	Diagnostic and statistical manual of mental disorders
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GR	Receptor de glicocorticóide
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (hipotálamo-hipófise-adrenal)
IBRAG	Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes
IRSS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
IMAO	Inibidores da monoaminaoxidase
NE	Norepinefrina
OMS	Organização Mundial da Saúde
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
SMU	Separação materna única
SMC	Separação materna crônica
FLU	Fluoxetina
ASE	<i>Açaí stone extract</i>
SNC	Sistema nervoso central
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Fisiopatologia da depressão	20
1.1.1	<u>Hipótese Monoaminérgica</u>	21
1.1.2	<u>Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA); Receptor de Glicocorticoide (GR);Hormônio Liberador de Corticotropinan (CRH)</u>	22
1.1.3	<u>Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro/Receptor Quinase Relacionado a Tropomiosina (BDNF/TrkB)</u>	25
1.1.4	<u>Nucleotídeos cíclicos</u>	30
1.1.5	<u>Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma-gama (PPARγ)</u>	33
1.2	Estresse oxidativo	34
1.2.1	<u>Radicais livres e mecanismos de defesa antioxidante</u>	35
1.2.2	<u>Estresse oxidativo e depressão</u>	38
1.3	Modelo experimental de depressão	40
1.4	Tratamento farmacológico da depressão	41
1.5	Plantas medicinais e a depressão	44
1.6	Extrato hidroalcoólico do caroço da <i>Euterpe Oleracea</i> Mart.	45
2	OBJETIVO DO ESTUDO	50
2.1	Objetivo Geral	50
2.2	Objetivos específicos	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	Preparado do extrato hidroalcoólico do caroço da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	51
3.2	Animais	52
3.2.1	<u>Delineamento experimental</u>	53
3.2.2	<u>Separação materna única e crônica</u>	54
3.3	Testes de comportamento	54
3.3.1	<u>Teste do campo aberto</u>	55
3.3.2	<u>Teste do nado forçado (teste de Porsolt)</u>	56
3.4	Análise da expressão de proteínas por Western Blotting	57
3.5	Determinação por imunoenensaio enzimática (ELISA)	58

3.6	Ensaio pró-oxidantes	58
3.6.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)</u>	58
3.6.2	<u>Carbonilação de proteínas</u>	59
3.7	Atividades das enzimas antioxidantes	60
3.7.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u>	60
3.7.2	<u>Medida de catalase</u>	61
3.7.3	<u>Medida da glutatona peroxidase</u>	61
3.8	Medida de nitrito	62
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5	RESULTADOS	64
5.1	Testes comportamentais	64
5.1.1	<u>Efeito do tratamento com ASE E COM ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos controles submetidos ao teste de Porsolt</u>	64
5.1.2	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos submetidos à separação materna crônica no teste de Porsolt</u>	65
5.1.3	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos submetidos à separação materna única no teste de Porsolt</u>	67
5.1.4	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora de ratos controles submetidos ao teste de campo aberto</u>	68
5.1.5	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à separação materna crônica no teste de campo aberto</u>	70
5.1.6	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à separação materna única no teste de campo aberto</u>	71
5.2	Determinação da quantificação de proteínas por ELISA	73
5.2.1	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos controles</u>	73
5.2.2	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos submetidos à separação materna crônica</u>	74

5.2.3	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos submetidos à separação materna única</u>	75
5.2.4	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos controles</u>	76
5.2.5	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos submetidos à separação materna crônica</u>	77
5.2.6	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de CRH e GR em ratos submetidos à separação materna única</u>	78
5.2.7	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TrkB em ratos controles</u>	79
5.2.8	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TRkB em ratos submetidos à separação materna crônica</u>	80
5.2.9	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TRkB em ratos submetidos à separação materna única</u>	81
5.3	Determinação da expressão de proteínas por Western Blotting	82
5.3.1	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão Do BDNF em ratos controles</u>	82
5.3.2	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a separação materna crônica</u>	83
5.3.3	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a separação materna única</u>	79
5.3.4	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos controles no hipocampo e no hipotálamo</u>	80
5.3	Determinação da expressão de proteínas por Western Blotting	76
5.3.2	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a separação materna crônica</u>	78
5.3.3	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a separação materna única</u>	84
5.3.4	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos controles no hipocampo e no hipotálamo</u>	85

5.3.5	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos submetidos à separação materna crônica no hipocampo e hipotálamo</u>	87
5.3.6	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos submetidos à separação materna única no hipocampo e no hipotálamo</u>	88
5.3.7	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos controles no hipocampo e no hipotálamo</u>	90
5.3.8	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos submetidos à separação materna crônica no hipocampo e hipotálamo</u>	91
5.3.9	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos submetidos à separação materna única no hipocampo e hipotálamo</u>	92
5.3.10	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPARγ em ratos controles no hipocampo e no hipotálamo</u>	94
5.3.11	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPARγ em ratos submetidos à separação materna crônica no hipocampo e hipotálamo</u>	95
5.3.12	<u>Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPARγ em ratos submetidos à separação materna única no hipocampo e Hipotálamo</u>	96
5.4	Ensaio pró-oxidantes, atividade enzimática antioxidante e medida de nitrito	97
5.4.1	<u>Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de MDA</u>	97
5.4.2	<u>Efeito do tratamento com ASE sobre a carbonilação de proteínas</u>	100
5.4.3	<u>Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade das enzimas oxidantes</u>	102
5.4.3.1	Superóxido dismutase (SOD).....	102
5.4.3.2	Catalase.....	104
5.4.3.4	Glutathione Peroxidase (GPx).....	106
5.4.4	<u>Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de nitrito</u>	108
6	DISCUSSÃO	110
	CONCLUSÃO	129
	REFERÊNCIAS	131

INTRODUÇÃO

Distúrbios do sistema nervoso central (SNC) afetam milhões de pessoas no mundo, podendo, em geral, comprometer vários aspectos do comportamento humano, tais como pensamento, emoções, memória, sensações, linguagem, equilíbrio e movimento. Em 2002, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no mundo, aproximadamente 450 milhões de pessoas já sofriam com algum tipo de doença mental. Esse número atingiu 700 milhões em 2013 e, segundo a OMS, representa 13% de todas as doenças, sendo que os transtornos mentais mais comuns se referem a duas principais categorias de diagnóstico: transtornos de ansiedade e transtornos depressivos.

Esses dois transtornos são altamente prevalentes na população e impactam o humor ou os sentimentos de pessoas acometidas. Os sintomas variam em termos de gravidade (de leve a grave) e duração (de meses a anos). Ambos os transtornos são condições diagnosticáveis de saúde e distintos dos sentimentos de tristeza, estresse ou medo que qualquer pessoa possa experimentar de tempos em tempos, ao longo de sua vida (DSM-5).

Nemeroff, em 2008, destacou que as taxas de depressão maior nos Estados Unidos aumentaram acentuadamente durante o período de 1991-1992 a 2001-2002 (de 3,33% para 7,06%), demonstrando que a depressão era um fator de risco significativo para o suicídio que, naquela década, já representava uma das principais causas de morte no mundo, especialmente em adolescentes, adultos jovens e idosos. A depressão também foi apresentada por Nemeroff (2008) como um importante fator de risco tanto para o desenvolvimento de doença cardiovascular, incluindo infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva, assim como para uma resposta reduzida ao tratamento nesses pacientes.

Em 2015, estimou-se que mais de 300 milhões de pessoas sofriam de depressão (17 milhões delas somente no Brasil), o equivalente a 4,4% da população mundial. Quase a totalidade desse número sofre ainda de ansiedade, uma vez que muitas pessoas experimentam as duas comorbidades simultaneamente (OMS, 2016, 2017).

A depressão também é classificada pela OMS como o maior contribuinte individual para a incapacidade no mundo (7,5% de todos os anos vividos com

inaptidão em 2015), sendo também o principal contribuinte para as mortes por suicídio, que chegam a 800 mil por ano. As consequências desse transtorno em termos de gasto de saúde pública são enormes. É oportuno ressaltar que, de acordo com a OMS, a população brasileira é a mais deprimida da América Latina (GAVIOLI *et al.*, 2013; OMS, 2017; BAIMA; GRANDELLE, 2017).

Muito embora a depressão possa afetar pessoas de todas as idades e de todas as classes sociais, o risco de desenvolvimento desse transtorno de humor é aumentado pela pobreza, desemprego, vicissitudes da vida como a morte de um ente querido ou um rompimento de relacionamento, problemas causados pelo uso de álcool e drogas, doença física e experiências precoces adversas na infância (OMS, 2017; MACRÌ; CHIAROTTI; WÜRBEL, 2008).

De acordo com sua identificação, a depressão é comumente classificada pela Classificação Internacional de Doenças, 10a. Revisão (CID.10) (OMS, 1992) e pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª revisão (DSM-5). A primeira é publicada pela OMS e a segunda pela *American Psychiatry Association* (APA).

Segundo a CID.10, o quadro que se entende por depressão está classificado dentro dos Transtornos Afetivos, ou seja, aqueles nos quais a perturbação fundamental é uma alteração do humor ou afeto, na qual se enquadra a depressão (com ou sem ansiedade associada) ou uma euforia. Em geral, a alteração do humor é seguida pela alteração sistêmica de atividade, e a maioria dos episódios destes transtornos tende a ser recorrente e pode estar associada às situações ou fatos estressantes.

Entretanto, a classificação mais bem aceita e utilizada é a do DSM-5 que fundamenta a classificação da depressão em episódios depressivos e a engloba dentro dos transtornos do humor (afeto), a saber, transtorno disruptivo da desregulação do humor, transtorno depressivo maior (mais comumente chamado Depressão Maior), transtorno depressivo persistente (distímia), transtorno depressivo induzido por substância/medicamento, transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno depressivo devido a outra condição médica, outro transtorno depressivo especificado e transtorno depressivo não especificado (APA, 2014).

Desses transtornos, a depressão maior (DM) representa a principal condição e, em geral, é caracterizada por alterações no humor (afeto), na cognição e em funções neurovegetativas (DSM-5). De acordo com a DSM-5, o diagnóstico da DM pode ser

estabelecido quando o indivíduo apresenta cinco (ou mais) dos sintomas listados abaixo (durante o mesmo período de duas semanas):

1. Humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias (sente-se triste, vazio, sem esperança ou parece choroso, humor irritável em crianças e adolescentes);
2. Acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias;
3. Perda ou ganho significativo do peso corporal sem estar fazendo dieta, ou redução ou aumento do apetite quase todos os dias;
4. Insônia ou hipersonia quase todos os dias;
5. Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias;
6. Fadiga ou perda de energia quase todos os dias;
7. Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva quase todos os dias;
8. Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, ou indecisão, quase todos os dias;
9. Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida recorrente, uma tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio;

O conjunto desses sintomas representa um episódio depressivo maior e causa prejuízo aos aspectos sociais, profissionais ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo. Vale ressaltar que o episódio não é atribuível aos efeitos fisiológicos de uma substância ou a outra condição médica (APA, 2014).

Em virtude dos aspectos mencionados, percebe-se a importância do estudo das bases biológicas da depressão e os esforços envidados no mundo científico para o desenvolvimento de fármacos antidepressivos com o mínimo de efeitos colaterais. No intuito de se compreender as causas da depressão, muitas hipóteses fisiopatológicas são descritas e vários estudos sugerem que diferentes substâncias estão envolvidas na sua fisiopatologia (HOLMES *et al.*, 2003). A DM é geralmente tratada com antidepressivos, incluindo os tricíclicos (desipramina e imipramina), os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (IRSS; fluoxetina e paroxetina) e os inibidores da monoaminaoxidase (IMAO, fenelzina e trianilcipromina) (JUAN *et al.*, 2006).

Estudos com animais e evidências clínicas demonstram a participação de neurotransmissores monoaminérgicos [serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e

dopamina (DA)] e de fatores neurotróficos na patogênese da depressão (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001; PALAZIDOU, 2012).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Fisiopatologia da depressão

A coexistência de diversos sintomas relativos à depressão reflete a função alterada de muitas partes do encéfalo. Por esta razão, muita atenção tem se dado ao papel difuso dos sistemas modulatórios, com seus efeitos de longo alcance (BEAR *et al.*, 2017). Atualmente, uma combinação de fatores (genéticos, ambientais, imunológicos, neurogênese, deficiência de aminas biogênicas e endócrinos) tem sido implicados na patogênese da depressão (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018).

Indiscutivelmente, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (também chamado de eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)) fornece a principal ligação neurobiológica entre esses fatores e o desenvolvimento da depressão. Assim, estressores ambientais e fatores genéticos hereditários que atuam através de respostas imunológicas e endócrinas iniciam mudanças estruturais e funcionais em muitas regiões cerebrais, resultando em neurogênese e neurotransmissão catecolaminérgica disfuncionais que se manifestam como uma constelação de sintomas que são típicos da depressão (SHARPLEY; BITSIKA, 2010; SHARPLEY; AGNEW, 2011; JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018). Com efeito, estressores ambientais ativam o eixo HPA e aumentam a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH – do inglês – *corticotrophin releasing hormone*) levando à hipercortisolemia observada na depressão (NEMEROFF, 196; GILLESPIE; NEMEROFF; 2005; DU *et al.*, 2009). Todavia, a mera associação entre esses fatores e a depressão é inadequada para explicar completamente por que a depressão se desenvolve. Está claro, portanto, que a depressão é um distúrbio complexo no qual uma interação de múltiplos fatores contribui para seu desenvolvimento (NEMEROFF, 2008; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008; SHARPLEY; BITSIKA, 2010). Contudo, o eixo HPA fornece uma ligação central entre os vários fatores que contribuem para o desenvolvimento da depressão (RAISON; CAPURON; MILLER, 2006; SHARPLEY; BITSIKA, 2010), o que tem sido descrito como a "hipótese diastesia-estresse" (MONROE; SIMONS, 1991; BEAR *et al.*, 2017). Porém, recentemente novas pesquisas revelaram que a redução de fatores

de crescimento, principalmente o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) pode estar envolvido na gênese da depressão (DRZYZGA; MARCINOWSKA; OBUCHOWICZ, 2009; LEE; KIM, 2010; PERITO; FORTUNATO, 2012; PHILLIPS, 2017; MARSHALL *et al.*, 2018). Do mesmo modo, vários estudos destacam o papel da fosfodiesterase (PDE) nas funções celulares e possíveis mecanismos etiológicos mais recentes da depressão (VASANTMEGHNA; MANGOT, 2015).

1.1.1 Hipótese Monoaminérgica

Apesar das novas hipóteses que tratam da depressão, uma das mais antigas é a hipótese monoaminérgica proposta por Schildkraut em 1965 (RANG *et al.*, 2016), que postulou que a depressão está relacionada à redução da biossíntese do neurotransmissor monoaminérgico, Norepinefrina. Essa hipótese foi reformulada por Coppen *et al.* (1989) para incorporar também a 5-HT e a DA no encéfalo (VAN AMSTERDAM; OPPERHUIZEN, 1999). Essa hipótese ainda continua impulsionando o desenvolvimento clínico de novos antidepressivos (MORET; BRILEY, 2011). Praticamente todos os antidepressivos atualmente disponíveis agem em um ou mais mecanismos compatíveis com a hipótese das monoaminas: promovendo a inibição da recaptação de 5-HT ou NE pelo antagonismo inibitório pré-sináptico da 5-HT ou dos receptores da NE, ou ainda, inibição da monoamina oxidase. Todos esses mecanismos resultam em um aumento da neurotransmissão de 5-HT e/ou NE (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015). A confirmação da atividade clínica desses antidepressivos contribuiu muito para reforçar a hipótese das monoaminas (MORET; BRILEY, 2011).

Uma associação de características e sintomas específicos de depressão a uma deficiência ou disfunção desses neurotransmissores foi proposta. Assim, uma deficiência de 5-HT está relacionada com ansiedade, obsessões e compulsões; a neurotransmissão reduzida de NE está associada à diminuição do estado de alerta, baixa energia, problemas de desatenção, concentração e habilidade; enquanto a atividade disfuncional da dopamina (DA) é implicada em problemas de motivação, prazer e recompensa. Curiosamente, o aumento da atividade da 5-HT pode estar

associado a certos sintomas como fadiga (MARIN; MENZA, 2005; MORET; BRILEY, 2011).

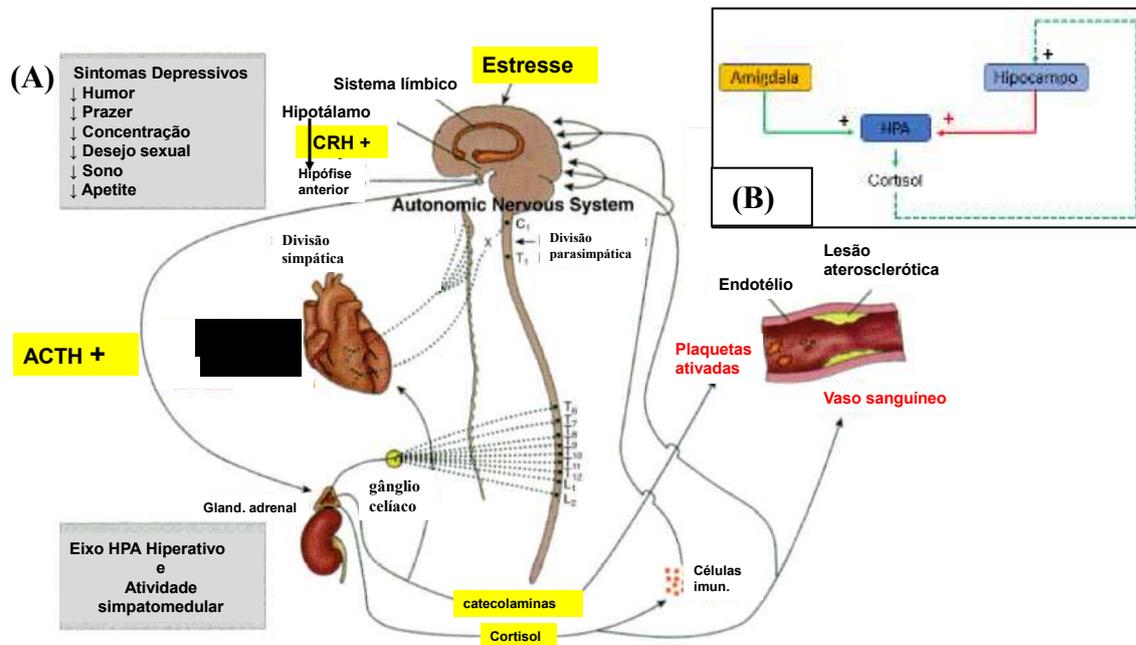
Várias linhas de evidência sugerem que a NE é o neurotransmissor de maior importância na fisiopatologia e no tratamento de transtornos depressivos (STAHL, 2008). Por exemplo, em seu relatório, Moret e Briley (2011) citam cinco principais linhas de evidência que apontam a importância da NE na depressão: (1) projeções de NE do *locus coeruleus* inervam o sistema límbico, que é implicado na regulação de emoções; (2) várias diferenças foram achadas nos elementos do sistema noradrenérgico dos cérebros *post mortem* de pacientes depressivos, comparados a controles sadios (NEMEROFF, 2008); (3) estudos genéticos mostram que camundongos com aumento funcional do sistema noradrenérgico geneticamente modificado são protegidos de comportamentos depressivos induzidos por estresse; (4) a depleção experimental da NE no cérebro resulta no retorno de sintomas depressivos após um tratamento bem-sucedido com fármacos antidepressivos que atuam no sistema NE e (5) agentes terapêuticos que aumentam especificamente a atividade da NE são antidepressivos reconhecidos como eficazes.

1.1.2 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA); Receptor de Glicocorticoide (GR); Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH).

Um estressor é um evento que ameaça de forma real ou imaginária a homeostase de um organismo. O estressor é percebido e interpretado pelo córtex frontal, hipocampo e a amígdala e avaliado se potencialmente nocivo; assim sendo, ativa o hipotálamo a secretar o CRH que estimula o lobo anterior da hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH liga-se aos receptores presentes nas glândulas adrenais e estimula a secreção de glicocorticóides (cortisol em humanos, corticosterona em roedores), levando a um aumento dos níveis de cortisol (ou corticosterona) no sangue, uma condição denominada hipercortisolemia (BEAR *et al.*, 2017). Esta sequência de eventos biológicos é denominada de eixo HPA. O cortisol (ou corticosterona) estimula um potente efeito sobre o metabolismo sistêmico, e no encéfalo ele atua diretamente em diversas

regiões; mas principalmente, exerce um controle de *feedback* negativo na liberação de CRH do hipotálamo (Figura 1A e 1B) (BAINS; CUSULIN; INQUE, 2015).

Figura 1: **A.** Relação entre o eixo HPA e a depressão.
B. Regulação do eixo HPA (feedback negativo pelo cortisol)



Fonte: Adaptado de NEMEROFF, 2008

Portanto, a ativação do eixo HPA leva à liberação de glicocorticoides (GC) pela glândula adrenal (supra-renal) (HERMAN; CULLINAN, 1997; HERMAN, 2018) e a persistência e intensidade exagerada do estresse, bem como a incapacidade do organismo em combater esse estresse, podem tornar o eixo hiper-reativo, com prejuízos potenciais ao organismo (HUETHER *et al.*, 1999).

Em pacientes deprimidos, o controle inibitório da atividade do eixo HPA está comprometido. Esses pacientes podem apresentar níveis basais elevados de cortisol, visto que apresentam hipersecreção do CRH e do cortisol, mecanismos de feedback de glicocorticoides disfuncionais, comprometimento da sinalização dos receptores GR e podem não responder ao teste de supressão com o corticosteroide sintético dexametasona (BAUNGARTNER; GRAF; KURTEN, 1985; HOLSBOER, 2000; SHER, *et al.*, 2013; JURUENA, 2014). Essas alterações no eixo HPA junto com a elevação crônica dos níveis do CRH estão associadas às desordens afetivas relacionadas ao

estresse em humanos, principalmente ansiedade e depressão (ARBORELIUS *et al.*, 1999; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; HOLSBOER; ISING, 2010; SUBHANI *et al.*, 2018).

Alguns sinais e sintomas depressivos, como excesso de culpa pessoal e desesperança, diminuição do apetite, perda de peso, diminuição do comportamento sexual, distúrbios do sono, atividade psicomotora alterada e resposta hiperativa a estressores psicológicos têm sido relacionados à disfunção do eixo HPA (LOPEZ-DURAN; KOVACS; GEORGE, 2009; SHER, *et al.*, 2013). Isso pode explicar em parte porque os pacientes com doença ou síndrome de Cushing (uma condição clínica na qual há hipersecreção de cortisol) frequentemente experimentam depressão (BRIGITTA, 2002; NEMEROFF, 2008). Com efeito, o envolvimento do eixo HPA na neurobiologia da depressão também foi demonstrado nos pacientes com síndrome de Cushing pela observação de que esses indivíduos apresentam déficits cognitivos e alterações na estrutura e na função do hipocampo semelhantes àsquelas encontradas em pacientes com depressão (STARKMAN *et al.*, 1992). A exposição a um agente emocional traumatizante parece ser um dos principais fatores ambientais que predisõem um indivíduo à depressão (MACRÌ; CHIAROTTI; WÜRBEL, 2008).

Vários fatores podem regular a atividade do eixo HPA, como a serotonina (5-HT), que estimula a liberação do CRH através dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C} e 5-HT₂ (POMPILI *et al.*, 2010). Pesquisas em animais e humanos demonstram que o CRH é crítico na fisiopatogenia da depressão (ARBORELIUS, 1999; INDA *et al.*, 2017). O CRH é um importante neurotransmissor e mediador da resposta neuroendócrina, cardiovascular, autonômica e imunológica, desempenhando assim um papel fundamental na resposta adaptativa e comportamental que ocorre durante períodos de estresse (NEMEROFF, 2008; BONFIGLIO, 2011; INDA *et al.*, 2017; JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018).

Estudos pré-clínicos em macacos Rhesus relacionam o estresse experimentado nos primeiros meses de vida com alterações no eixo HPA e consequentes mudanças nos níveis de CRH. Os macacos criados na ausência das mães respondem ao estresse do isolamento social com uma ativação mais vigorosa do eixo HPA e elevações do CRH no líquido cefalorraquidiano quando comparados aos controles (COPLAN *et al.*, 2001). Semelhantemente, a privação materna nos ratos aumenta os níveis de ACTH na adenohipófise e de CRH no hipotálamo (RÉUS *et al.*, 2011). A administração intraventricular de CRH induz mudanças comportamentais que

mimetizam a ansiedade no ser humano, e leva ao aumento das concentrações plasmáticas de epinefrina, norepinefrina, bem como ao aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, resultando na caracterização do estresse (KORTE; BOUWS; BOHUS, 1993; INDA *et al.*, 2017). No entanto, após administração sistêmica de CRH, esse efeito não é observado e tampouco reduzido pela hipofisectomia ou por supressão do eixo HPA com glicocorticóides (KOOB *et al.*, 1993). Portanto, esses aspectos mencionados sugerem que o circuito neuronal do SNC que se encontra além do eixo HPA desempenha um papel importante nos efeitos comportamentais mediados pelo CRH (VALENTINO, FOOTE, ASTON-JONES, 1983).

A hiperatividade do eixo HPA na depressão também pode ser atribuída a uma alteração nos receptores GRs localizados no sistema límbico-hipocampal (PARIANTE; MILLER, 2001). Os glicocorticoides promovem suas ações por meio de dois subtipos de receptores intracelulares, o receptor mineralocorticoide (RM) e RG (DE KLOET *et al.*, 1998). O receptor de mineralocorticoide (RM) tem alta afinidade pelos corticosteroides endógenos e o GR possui uma alta afinidade pelos glicocorticoides sintéticos; portanto, acredita-se que o GR seja mais importante, na regulação do eixo HPA por retroalimentação negativa, em resposta ao estresse quando os níveis endógenos de glicocorticoides estão aumentados (SPENCER *et al.*, 1998; DE KLOET *et al.*, 1998; ODAKA; ADACHI; NUMAKAWA, 2017; OKAMOTO *et al.*, 2015). No entanto, os pacientes com depressão não respondem à retroalimentação negativa em função do cortisol elevado (NEMEROFF, 1996, 2008), e essa situação foi descrita por vários estudos como sendo devido a uma função reduzida dos GRs em pacientes com depressão. Sugere-se que os antidepressivos atuem revertendo essa suposta alteração, aumentando a expressão dos GRs (intensificando sua função) e a atividade do eixo HPA (PARIANTE; MILLER, 2001; NIKISCH *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2014).

1.1.3 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro/ Receptor Quinase Relacionado a Tropomiosina (BDNF/TrkB)

Tratamentos efetivos para a depressão estão disponíveis há mais de 35 anos, mas os efeitos neuroquímicos subjacentes à ação terapêutica desses tratamentos

permanecem em grande parte desconhecidos. Muitos antidepressivos aumentam imediatamente os níveis de monoaminas, mas o requerimento pela administração crônica e repetitiva tem levado à hipótese de que adaptações de longo prazo são necessárias para as ações terapêuticas desses tratamentos (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1994; NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995). Da mesma forma, o mecanismo de ação dos choques eletroconvulsivos (ECS), provavelmente o tratamento mais eficaz para a depressão, incluindo casos que não respondem a esquemas antidepressivos, não tiveram seus efeitos de longo prazo identificados (SINGH; KAR, 2017). Trabalhos recentes levantaram a nova possibilidade de que entre os muitos alvos de longo prazo de tratamentos antidepressivos, as neurotrofinas podem ser um deles (KRISHNAN; NESTLER, 2008; BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015; PHILLIPS, 2017; MARSHALL *et al.*, 2018). As neurotrofinas promovem o crescimento e desenvolvimento de neurônios imaturos e melhoram a sobrevivência e função de neurônios adultos (NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995; KAO *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm concentrado seus estudos sobre a importância das neurotrofinas envolvidas na plasticidade celular. Uma das mais importantes neurotrofinas é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), segundo membro da família “neurotrófica” de fatores neurotróficos, que, em 1982, demonstrou promover sobrevivência de uma subpopulação de neurônios do gânglio da raiz dorsal (BARDE *et al.*, 1982). Cada neurotrofina se liga a um ou mais dos receptores quinase relacionados a tropomiosina (Trk), membros da família dos receptores tirosina kinases (PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001; BINDER e SCHARFMAN, 2004; PHILLIPS, 2017).

O BDNF se liga ao receptor TrkB (Figura 2), que existe tanto na forma de comprimento total (TrkB.FL) como nas formas truncadas (TrkB.T1. TrkB.T2) sem o domínio quinase (EIDE *et al.*, 1996; FRYER *et al.*, 1997). Embora a maioria das funções atribuídas ao BDNF esteja associada ao TrkB.FL, vários papéis têm sido sugeridos para os receptores truncados, incluindo crescimento, desenvolvimento (FRYER *et al.*, 1997), modulação negativa da expressão e da função do receptor TrkB (EIDE *et al.*, 1996; HAAPASALO *et al.*, 2001, 2002). Os mRNA do BDNF e do TrkB têm ampla distribuição no sistema nervoso central, onde o BDNF é transportado de forma anterógrada. O pró-BDNF é transportado a partir da Rede Trans do Golgi em grânulos de secreção, onde é clivado pelo pro-hormônio convertase 1 (PC1) em BDNF (BINDER; SHARMAN, 2004; PHILLIPS, 2017; MARSHALL *et al.*, 2018).

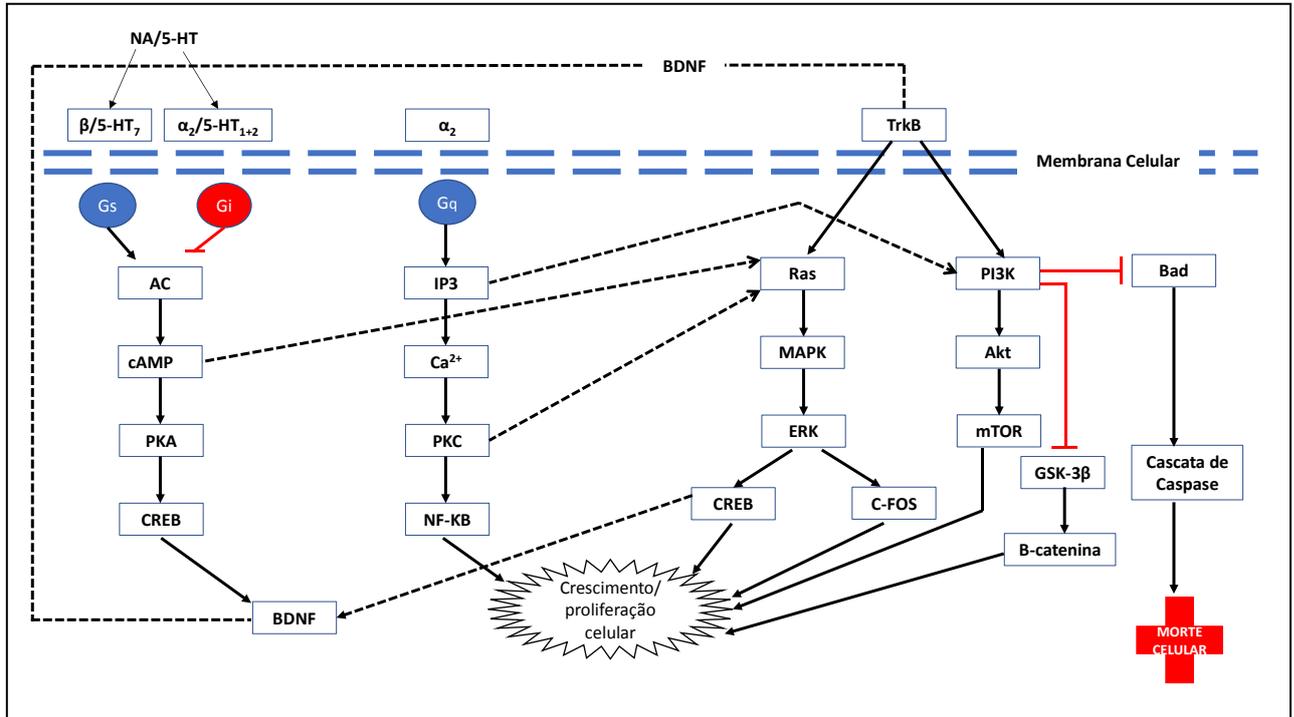
A sinalização do BDNF também pode estar envolvida em comportamentos afetivos (ALTAR, 1999). Os efeitos do BDNF são principalmente mediados pela inibição das vias de morte celular e ativação das vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos - originalmente quinases reguladas por sinais extracelulares - (MAPK/ERK) e as vias fosfatidil inositol-3 quinase (PI-3K)/Akt (proteína quinase serina/treonina) (Figura 2). O aumento da atividade dos receptores serotoninérgicos e adrenérgicos ativa a cascata do cAMP que, por sua vez, leva à ativação do CREB (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015). Esse aumento de cAMP acaba levando ao aumento da expressão do BDNF que subsequentemente ativa a via MAPK/ERK que é uma via importante envolvida no crescimento e proliferação celular (RÉUS *et al.*, 2014). Os neurônios monoaminérgicos experimentam um aumento no crescimento após a ativação da via MAPK/ERK, sendo assim, essa via é responsável pela forma como o BDNF modula o sistema monoaminérgico (DUMAN; VOLETI, 2012). A ativação da cascata da via PI-3K pelo BDNF leva à fosforilação de Akt, uma molécula medeia seus efeitos entre a sobrevivência celular e morte celular (KAMADA *et al.*, 2007) (Figura 2). A ativação da Akt após a fosforilação leva à atividade aumentada de mTOR, responsável pela regulação da expressão de vários genes envolvidos no crescimento celular, particularmente um grupo de genes associados a sinapse e que tem sido diretamente ligado a eventos neuroplásticos (LI *et al.*, 2010). Por outro lado, a inativação de Akt pela desfosforilação leva a uma diminuição na fosforilação e subsequente ativação do agente promotor de morte celular associado a Bcl-xL/Bcl-2 (Bad) (Figura 2), uma molécula pró-apoptótica (KAMADA *et al.*, 2007). Portanto, em virtude dos aspectos mencionados, evidencia-se que a associação das vias MAPK/ERK e PI-3K é, em grande parte, responsável pelos eventos de neuroplasticidade que ocorrem durante a resposta antidepressiva e, além disso, vincula diretamente as ações do BDNF a esses processos (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015).

O estresse ambiental, como imobilização, que induz depressão também diminui o mRNA do BDNF (SMITH *et al.*, 1995). Estudos mostraram que antidepressivos eficazes aumentam o mRNA do BDNF (DIAS *et al.*, 2003; BAJ *et al.*, 2012) e a expressão do BDNF (CHEN *et al.*, 2001; ALTAR *et al.*, 2003). Além disso, tem sido relatado que níveis desta neurotrofina estão reduzidos no soro e em amostras de cérebros *post mortem* de pacientes com depressão, bem como a atenuação da sua neurogênese foi encontrada nos cérebros de animais expostos a um modelo de

estresse crônico (IBARGUEN-VARGAS, 2008). Outrossim, foi demonstrado que a secreção exógena do BDNF promove a função e o crescimento de neurônios serotoninérgicos em cérebros de ratos adultos (MAMOUNAS *et al.*, 1995) e camundongos deficientes em BDNF também são deficientes em inervação serotoninérgica (LYONS *et al.*, 1999).

Um importante papel tem sido atribuído ao BDNF, a neurotrofina mais abundante no cérebro, na ação dos tratamentos antidepressivos, sendo apoiado por várias linhas de evidências. 1) Convulsões induzidas por energia elétrica ou química aumentam a expressão do BDNF e seu receptor, TrkB, no cérebro (ERNFORS *et al.*, 1991; ISACKSON *et al.*, 1991). 2) A infusão local de BDNF no mesencéfalo tem efeitos antidepressivos em dois modelos comportamentais de depressão: o teste de nado forçado (TNF) e os paradigmas do desamparo aprendido (SIUCIAK *et al.*, 1994), sugerindo que o aumento da expressão do BDNF endógeno pode ter efeitos antidepressivos. 3) O estresse diminui a expressão do BDNF no hipocampo e em outras regiões límbicas do cérebro (SMITH *et al.*, 1995), um efeito que poderia contribuir para a atrofia que ocorre em neurônios vulneráveis ao estresse no hipocampo (UNO *et al.*, 1989; WATANABE; GOULD; McEWEN, 1992; STEIN-BEHRENS *et al.*, 1994). A atrofia induzida pelo estresse e, em casos extremos, a morte celular, podem contribuir para a perda do controle hipocampal do eixo HPA e para o hipercortisolismo frequentemente exibido na depressão (JACOBSON; SAPOLSKY, 1991; YOUNG *et al.*, 1991).

Figura 2: Uma visão geral das principais moléculas neuroprotetoras e neurotóxicas envolvidas na neuroplasticidade induzida por fármacos (antidepressivos etc.).



Legendas: (β): receptor beta-adrenérgico; (α₂): receptor alfa-2 adrenérgico; (TrkB): Receptor de BDNF (ver o texto para detalhes / abreviaturas adicionais que não são aqui mencionados).

Fonte: Adaptado de BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015

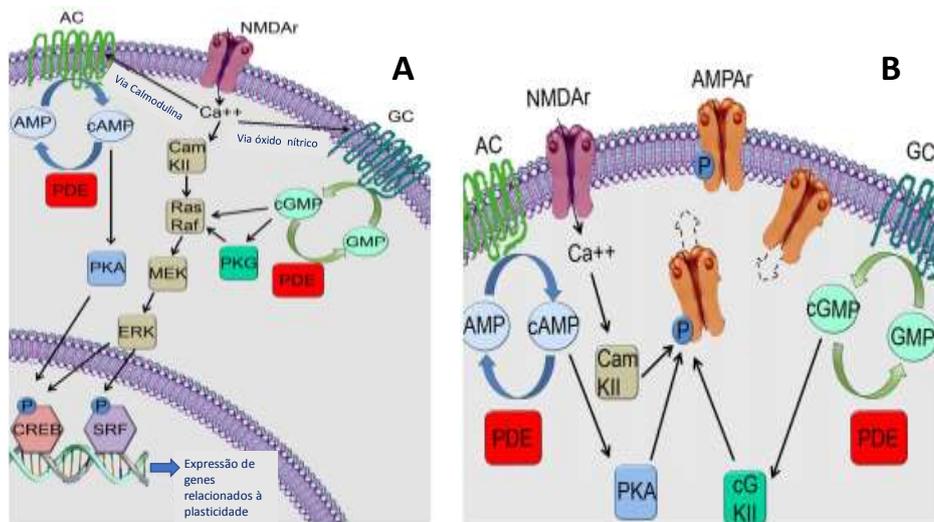
Portanto, percebe-se que o BDNF é um alvo de primordial importância na neurobiologia e no tratamento da depressão, assim, novas estratégias de fármacos estão focadas no papel antidepressivo potencial do BDNF (figura 2) (BINDER e SCHARFMAN, 2004; BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015; PHILLIPS, 2017; MARSHALL *et al.*, 2018).

1.1.4 Nucleotídeos Cíclicos

As fosfodiesterases (PDE) representam novos alvos na medicina. Essas enzimas são metabolizadoras de nucleotídeos cíclicos, alguns dos mediadores chave de funções celulares no corpo e, portanto, são sítios atrativos para modulações induzidas por fármacos. Pesquisas sobre moléculas que alteram as ações da PDE tem se expandido no campo da psiquiatria e das neurociências, nos últimos tempos. Por exemplo, a introdução do benzodiazepínico Tofisopam que é um ansiolítico não sedativo, que não atua no sítio do receptor do ácido gama aminobutírico (GABA), mas tem ações inibitórias na PDE, possuindo propriedades ansiolíticas sem ter ações sedativas, anticonvulsivantes, amnésicas ou relaxantes musculares (VASANTMEGHNA; MANGOT, 2015).

Quando um ligante se liga ao seu receptor da superfície celular, a concentração de moléculas intracelulares chamadas de segundos mensageiros é alterada, o que resulta na transmissão do sinal dentro da célula. Estes incluem adenosina 3', 5-monofosfato cíclico (cAMP), íons de cálcio (Ca^{2+}), diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) (RANG et al, 2016). As PDEs de nucleotídeos cíclicos são uma família de enzimas onipresentes, que seletivamente hidrolisam a ligação 3' do fosfato cíclico no cAMP e/ou guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP). O cAMP e o cGMP são conhecidos como os segundos mensageiros na cascata de sinalização intracelular. São moléculas ativas que são produzidas pela ação das enzimas adenilil ou guanililciclase sobre o ATP e o GTP respectivamente. O cAMP/cGMP na maioria das vezes ativam proteínas quinases específicas, que regulam a sinalização celular (Figura 3). Por outro lado, sempre que é necessário interromper a sinalização intracelular, ocorre a inativação desses segundos mensageiros pela hidrólise das ligações de fosfato cíclico pela PDE. Isso causa uma redução na transmissão do sinal intracelular (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015; RANG *et al.*, 2016).

Figura 3: **A.** Inibição de PDEs leva a aumento de cAMP e cGMP culminando à expressão de genes relacionados à plasticidade. **B.** Inibição de PDEs pode levar à fosforilação de receptores AMPA e sua incorporação na sinapse.



Fonte: Adaptado de MEDINA, 2011.

Atualmente, são identificadas 11 isoenzimas de PDE. Cada isoenzima possui várias isoformas. As PDEs são distribuídas em quase todas as células, mas são suas várias isoenzimas, e isoformas, que são expressas diferencialmente em vários tecidos (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006).

A inibição das PDEs pode promover a plasticidade neuronal. Sabe-se que a transmissão glutamatérgica leva a um aumento dos níveis intracelulares de Ca⁺⁺ e AMPc/cGMP, desencadeando cascatas que levarão à fosforilação e ativação dos fatores de transcrição como a proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP (CREB) e fator de resposta sérica (SRF) (Figura 4A). A ativação do CREB e/ou SRF pode levar à expressão de genes relacionados à plasticidade, que por sua vez promovem as alterações funcionais e morfológicas necessárias para que a plasticidade neuronal ocorra (ATKINS *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1998; JOSSELYN; NGUYEN, 2005; ETKIN *et al.*, 2006; PINTCHOVSKI *et al.*, 2009).

Outra maneira pela qual a inibição da PDE pode melhorar a plasticidade neuronal é através da potencialização da transmissão glutamatérgica (Figura 3B). O aumento nos níveis de cAMP/ cGMP, causado pela inibição da PDE, pode levar à fosforilação dos receptores AMPA promovendo sua incorporação na sinapse

(SERULLE *et al.*, 2007) ocasionando a facilitação da transmissão glutamatérgica. Os receptores AMPA também podem entrar e sair da membrana sináptica afetando a transmissão glutamatérgica, tornando os receptores do ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) funcionais (MEDINA, 2011).

Desde os anos 80, o rolipram, inibidor seletivo da PDE4, foi investigado por seus potenciais efeitos antidepressivos. Existem vários mecanismos possíveis pelos quais esse efeito é alcançado. Por exemplo, estimulação da tirosina hidroxilase, aumentando a disponibilidade de 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA); aumento na síntese e liberação de norepinefrina e indução de BDNF como um resultado da inibição da PDE4 (REDROBE *et al.*, 2014). Verificou-se ser comparável aos antidepressivos tricíclicos em eficácia, sem os efeitos adversos anticolinérgicos perturbadores que têm reduzido amplamente a popularidade dos antidepressivos tricíclicos (BOBON *et al.*, 1988; REDROBE *et al.*, 2014). Muito embora o rolipram tenha sido um protótipo para alguns medicamentos desenvolvidos posteriormente, o fabricante o abandonou como antidepressivo porque sua dosagem efetiva causou efeitos colaterais adversos significativos. Entretanto, o rolipram pode acelerar a atividade dos proteossomas para a eliminação de agregados proteicos tóxicos que levam a doenças neurodegenerativas (MYEKU *et al.*, 2016; ACS, 2016).

Todavia, muitos estudos apontam que os inibidores de PDE4 demonstram ter ações antidepressivas, antipsicóticas e que aumentam a memória em modelos de roedores e em humanos (O'DONNELL; ZHANG, 2004; KANES *et al.*, 2007; HALENE; SIEGEL 2008; MUELLER; HOFMANN; CHERRY, 2010; TITUS *et al.* 2013; BOLGER, 2017). Um estudo realizado na Índia, demonstrou a eficácia do Cilostazol, um inibidor da PDE3, em modelos de depressão e ansiedade em camundongos (PATEL; ANAND; BHATT, 2012). Neste estudo, o TNF e teste de suspensão da cauda foram os modelos de depressão e o tempo de imobilidade medido indicou o efeito antidepressivo. Outro estudo a destacar diz respeito ao inibidor da PDE2, "Bay 60-7550" que regulou os níveis de superóxido dismutase de Cu/Zn diferencialmente no hipocampo e na amígdala, quando administrado antes do estresse crônico. O inibidor também regulou as anormalidades de Bax, Caspase 3 e Bcl-2, que desempenham papel importante na apoptose (DEVAN *et al.*, 2005).

Aliado ao estresse, o eixo HPA disfuncional ou o equilíbrio oxidativo/antioxidante também desempenham um papel muito importante na precipitação/agravamento da ansiedade e da depressão (VASANTMEGHNA;

MANGOT, 2015). Assim, a inibição de PDEs pode ser uma estratégia de tratamento inovadora para desordens psiquiátricas, tais como depressão e ansiedade, aliviando o estresse oxidativo e modulando a maquinaria apoptótica (Figura 4).

Os inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) são comumente usados para tratar a disfunção erétil (DE), mas também apresentam propriedades benéficas adicionais, como os efeitos sobre a hipertensão pulmonar e a hiperplasia prostática benigna (SHIM *et al.*, 2013; LAN *et al.*, 2018; CALOGERO *et al.*, 2018).

Além disso, os inibidores da PDE5 são conhecidos por serem eficazes no tratamento de acidentes vasculares cerebrais e no déficit cognitivo. Esses medicamentos atravessam prontamente a barreira hematoencefálica e a administração subcrônica do sildenafil demonstrou aumentar o cGMP cortical em modelo animal. Estas concentrações aumentadas na via intracelular ativam os receptores NMDA, para mediar a potencialização a longo prazo e a consolidação da memória (SHIM *et al.*, 2013). Os nucleotídeos cíclicos têm papéis críticos na regulação da plasticidade sináptica e, conseqüentemente, os inibidores de PDE são de considerável interesse como tratamentos para disfunção cognitiva, depressão e somatização (SHIM *et al.*, 2013).

1.1.5 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma – gama (PPAR γ)

Dados na literatura apontam a ativação dos receptores ativados por proliferadores do peroxissoma (PPARs) como um dos mecanismos envolvidos no contrabalanço endógeno quando ocorre um estímulo inflamatório ou imunológico (GALEA *et al.*, 2003; KAPADIA *et al.*, 2008). Estes receptores constituem uma subfamília incluída na superfamília de receptores hormonais nucleares (HOUSEKNECHT *et al.*, 2002), atuando como fatores de transcrição dependentes de ligantes, e regulando a expressão de genes relacionados a lipídios, ao metabolismo da glicose, a processos inflamatórios e a diferenciação celular (KAPADIA *et al.*, 2008). Os receptores PPARs são expressos principalmente no encéfalo e nas células imunes periféricas (HENEKA; LANDRETH, 2007).

Estudos demonstraram que os PPARs (principalmente a isoforma PPAR γ) são reguladores mestres da fisiologia cerebral e potenciais alvos terapêuticos para o

tratamento de várias condições patológicas relacionadas à neuroinflamação no SNC. Assim, as funções anti-inflamatórias do PPAR γ receberam muita atenção desde que os seus agonistas mostraram exercer um amplo espectro de efeitos protetores em diversos modelos animais de doenças neurológica e cardiovascular (FEINSTEIN, 2003; HENEKA; LANDRETH, 2007; KAPADIA *et al.*, 2008). Além disso, García-Bueno *et al.* (2005) demonstraram que tanto os ligantes sintéticos como naturais de PPAR γ previnem o efeito inflamatório e as consequências oxidativas/nitrosativas da exposição ao estresse no cérebro. Waku *et al.* (2010) demonstraram que os metabólitos da 5-HT atuam como agonistas do receptor PPAR γ na periferia, o que indica ainda a possibilidade de uma ligação subjacente entre as vias bioquímicas dos transtornos de humor, do efeito pró-inflamatório e do dano oxidativo. Ademais, a existência de um mecanismo pró-energético anti-citotóxico para agonistas do PPAR γ no cérebro estressado também tem sido sugerido (MARTÍNEZ-GRAS *et al.*, 2011).

1.2 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Em condições fisiológicas normais as EROs encontram-se em baixas concentrações. Entretanto, têm efeitos deletérios quando produzidas em excesso, o que gera uma condição patológica no organismo (Ahmed & Tang, 2012). Em condições patológicas, o estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a formação e remoção dessas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes (TOUYZ, 2004; DURACKOVA, 2010). O estresse oxidativo pode ser definido como a oxidação de macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas, DNA, carboidratos, e ocorre quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (CAI; HARRISON, 2000). As EROs são geradas principalmente por reação-redox em organismos vivos (WANG *et al.*, 2009).

As EROs, por definição, são moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico ou molecular (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estas são derivadas do metabolismo do oxigênio encontradas no

ambiente e em todos os sistemas biológicos (TOUYZ; SHIFFRIN, 2004; MONTEZANO, 2015). A formação das referidas moléculas é determinada pela perda ou ganho de um elétron, ficando o outro desemparelhado. A formação das EROs ocorre durante os processos oxidativos biológicos, sendo assim formados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos. Da mesma forma, podem ser oriundos do metabolismo de alguns compostos exógenos ao organismo, gerando diferentes radicais livres (BELLÓ, 2002).

As EROs possuem uma importante função de defesa nos organismos vivos, pois combatem muitos agentes infecciosos. Elas influenciam as funções cerebrais, vasculares, renais e cardíacas, e podem influenciar essas funções por modulação do crescimento celular, contração/dilatação e respostas inflamatórias por vias de sinalização redox-dependentes (TOUYZ; BRIONES, 2011; MONTEZANO *et al.*, 2015).

1.2.1 Radicais livres e mecanismos de defesa antioxidante

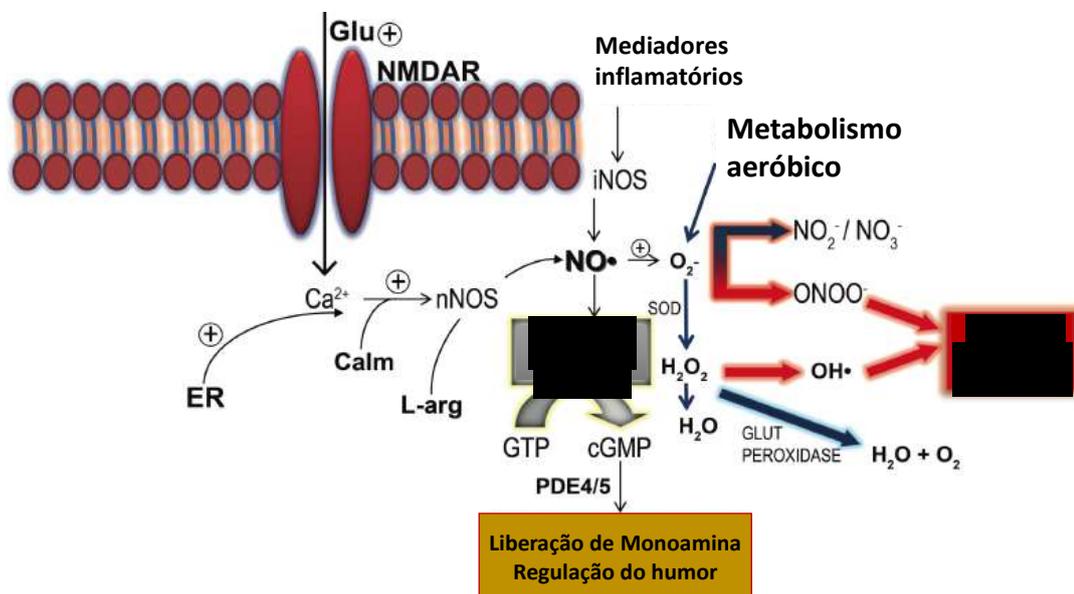
Por sua elevada reatividade, os radicais livres, produzidos a partir de transferências de elétrons, podem reagir e formar uma série de compostos intermediários altamente reativos, tais como as EROs, e, obviamente, quando não neutralizadas, podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e promover dano tecidual. Dentre esses radicais, destacam-se, o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), radical peróxido ($\text{ROO}\cdot$) (BELLÓ, 2002; LOUKIDES; BAKAKOS; KOSTIKAS, 2011); bem como as espécies reativas do nitrogênio (ERN), tais como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^-) (MOSLEY *et al.*, 2006).

A mitocôndria é a principal organela produtora de EROs, sendo a NAD(P)H oxidase, a maior fonte. Outras fontes enzimáticas são capazes de gerar EROs, como a xantina oxidase, o citocromo p450, a ciclooxigenase e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. A enzima óxido nítrico sintase (NOS) que é responsável pela formação do óxido nítrico (NO), também é capaz de produzir O_2^- quando se encontra desacoplada, podendo ser uma importante fonte de EROs, pela formação de O_2^- e posteriormente de ONOO^- (TOUYZ, 2004). Com efeito, grande atenção tem sido dada

às ações bioquímicas e moleculares do NO, em condições normais, assim também como sua alteração potencial em condições patológicas como a depressão (GARG; KUMAR, 2008). Elevados níveis de ONOO^- , gerado a partir da inativação do NO pelo $\cdot\text{O}_2^-$, podem estar associados à fisiopatologia da depressão induzida pelo estresse (figura 4) (RICHARD; WANG; JELINEK, 2007; SANDERS; KORF, 2007; WEGENER *et al.*, 2009).

Os elementos gerados durante o metabolismo do oxigênio podem agredir os diferentes constituintes celulares, causando danos em lipídios, proteínas e DNA (KOHEN; NYSKA, 2002). A membrana é o constituinte celular mais vulnerável às EROs, devido à peroxidação lipídica e à oxidação de proteínas, uma vez que ela é formada por ácidos graxos insaturados e proteínas, levando a alterações na sua estrutura e na permeabilidade celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LIU *et al.*, 2014).

Figura 4: Interrelação entre Glutamato, o sistema cAMP/cGMP, PDE, estresse oxidativo, dano oxidativo, monoaminas, regulação do humor e atuação dos antioxidantes e antidepressivos



Fonte: Adaptado de BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015.

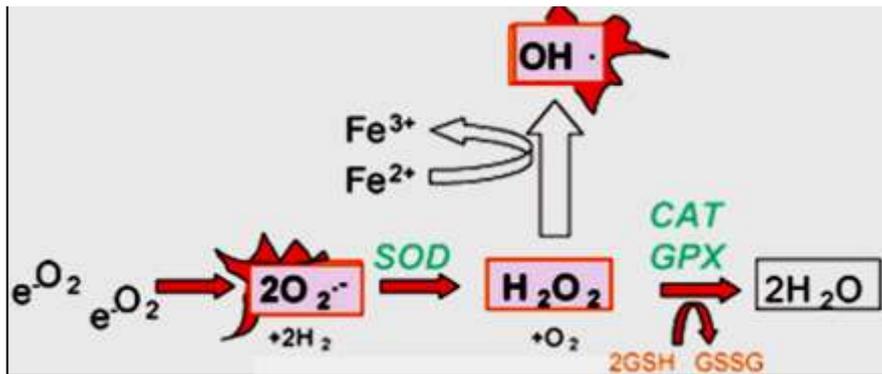
Para se proteger e evitar os danos causados pelas EROs, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SINGH *et al.*, 2010). O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das EROs ou seus precursores, inibição da formação das EROs, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo (BELLÓ, 2002).

O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina. Os antioxidantes não enzimáticos são exógenos em sua maioria. Os principais são: os bioflavonóides, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (alfa tocoferol) e outras pequenas moléculas (HALLIWELL, 1999; VIRDIS *et al.*, 2011).

As enzimas atuam como uma linha de defesa antioxidante do organismo. A primeira linha de defesa oxidante é ocasionada pela SOD. Existem três isoformas da enzima SOD, a forma cobre-zinco citosólica (CuZn-SOD, SOD1), a SOD-manganês na mitocôndria (Mn-SOD, SOD2) e a SOD extracelular (ecSOD, SOD3) (FRIDOVICH, 1997; MONTEZANO; TOUYZ, 2012; SANDSTROM *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995). A SOD é responsável por catalisar a conversão de dois radicais $O_2^{\cdot-}$, que são altamente reativos, em H_2O_2 , que é um pouco menos reativo, e O_2 na presença do próton H^+ (FRIDOVICH, 1995; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; WOLIN, 2000) (Figura 5).

Em animais, o H_2O_2 formado pela SOD é detoxificado pela CAT e pela GPx. A CAT é uma hemoproteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e também no citosol, que impede a formação do radical hidroxil e consequente dano celular, pois reage eficientemente com H_2O_2 e catalisa sua conversão em água e oxigênio ($H_2O + O_2$). A catalase está presente em todos os tipos de células de mamíferos, porém é uma enzima altamente específica, pois possui atividade apenas para peróxidos de hidrogênio, de etila e de metila (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

Figura 5: Ação catalisadora das enzimas antioxidantes sobre os agentes reativos.



Fonte: CORDEIRO, 2012.

A catalase é muito efetiva em níveis altos de estresse oxidativo e protege as células da produção de H_2O_2 . A suplementação de catalase exógena previne a oxidação de GSH mediada pelo H_2O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HECK *et al.*, 2010).

A GPx é uma enzima que contém selênio no seu sítio ativo, necessitando de selênio proveniente da dieta para exercer sua atividade antioxidante. Encontra-se tanto no citosol, como na mitocôndria (matriz mitocondrial) e no meio extracelular. A sua ação antioxidante é catalisar a redução de H_2O_2 a água e peróxidos orgânicos a seus correspondentes álcoois às custas da conversão de glutathiona (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Em seguida, a GSH é regenerada pela ação da glutathiona redutase (GR). Assim, ela protege células de mamíferos contra o dano oxidativo, sendo o metabolismo da glutathiona um dos mais essenciais mecanismos de defesa antioxidantes (DIAZ-VIVANCOS *et al.*, 2015).

1.2.2 Estresse oxidativo e depressão

Alterações na biologia oxidativa estão sendo reconhecidas amplamente como uma das causas do dano que envolve a fisiopatologia das doenças psiquiátricas induzidas pelo estresse (BERK, 2011). O aumento do estresse oxidativo ocorre na DM como evidenciado pela deficiência de mecanismos de defesa antioxidantes no plasma em associação com o aumento da peroxidação lipídica nesses pacientes (CHUNG *et*

al., 2013). Em 2014, Palta *et al.* mostraram que há uma relação estreita entre a depressão e o dano oxidativo do DNA. A depressão é caracterizada pela ativação da resposta inflamatória com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas, induzem a geração das ERNs e EROs, aumentando a peroxidação lipídica e o dano tecidual. As ERNs e EROs contribuem para o dano tecidual e lesão do DNA ao reagir com biomoléculas como os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (GEHRMANN; ELSNER; LENZEN, 2010; DANTZER *et al.*, 2011). Além disso, o estresse psicológico, que acompanha a depressão severa, é capaz de aumentar a peroxidação lipídica (YAGER; FORLENZA; MILLER, 2010).

Amoroso *et al.*, em 2000, apontaram que nos distúrbios do humor, o estresse oxidativo desencadeia ou exacerba inúmeras vias de danos tais como: a disfunção mitocondrial, desregulação da homeostase do cálcio e interrupção dos caminhos energéticos, ocasionando danos nos precursores neuronais, impedimento da neurogênese (KROEMER, 1997) e indução de eventos de sinalização na morte celular apoptótica (CREAGAN *et al.*, 2002). Os eventos mencionados contribuem significativamente para a fisiopatologia dos distúrbios depressivos, como evidenciado pelas alterações morfológicas no cérebro, por exemplo atrofia (COTTER *et al.*, 2002). Para contrabalancear esses danos, existem vários mecanismos de defesa antioxidantes no cérebro que neutralizam os danos das ERNs e EROs.

Contudo, com a depressão, a perda da eficiência desses mecanismos e as alterações do sistema de citocinas pró-inflamatórias resultam no aumento da formação de radicais livres (KIM; KIM, 2010). Além disso, as espécies reativas podem induzir dano neuronal via depleção do sistema antioxidante não-enzimático no cérebro e redução da atividade das enzimas antioxidantes como a glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase (LESGARDS *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstram que fármacos antidepressivos apresentam supra regulação da expressão gênica e aumento da atividade da superóxido dismutase (KOLLA *et al.*, 2005; RÉUS *et al.*, 2010; OMAR *et al.*, 2011).

1.3 Modelo experimental de Depressão

A exposição precoce a um ambiente adverso, ao estresse ou a traumatismos pode propiciar condições que levarão os organismos a uma variedade de doenças, desde desordens cardiovasculares até psicopatologias, que se manifestam tardiamente na vida em humanos e em animais (WINNICOTT, 1987; BARKER *et al.*, 1989; JOYNT; WHELLAN; O'CONNOR, 2003; MACRÌ; CHIAROTTI; WÜRBEL, 2008). Por exemplo, Post (1992) demonstrou que em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores ou eventos traumatizantes, principalmente de origem psicossocial (POST, 1992). Outros estudos demonstraram que os indivíduos que sofreram abusos físico, sexual e emocional ou que foram abandonados na infância apresentam um risco aumentado de desenvolver um transtorno emocional na vida adulta como: estresse pós-traumático, pânico, fobias, ansiedade generalizada, hiperatividade, déficit de atenção, transtornos depressivos etc. (WINNICOTT, 1948; BECK, 1976; HEIM; NEMEROFF, 2001; NEMEROFF, 2004). Isto posto, para mimetizar situações comportamentais humanas em animais, a maior parte dos modelos comportamentais animais, como os de depressão, tais como o teste do nado forçado (TNF), o estresse perinatal, o estresse crônico, avaliam o desenvolvimento de alterações comportamentais e fisiológicas em resposta à pré-exposição a evento traumatizante inescapável (PINTO *et al.*, 2008).

A separação materna vivida nas primeiras 24 horas após o nascimento é suficiente para alterar a atividade do eixo HPA e produzir, na idade adulta, diferentes alterações no comportamento animal. A título de exemplo, a separação materna altera as respostas a situações que envolvem medo, emocionalidade, bem como um comportamento condicionado a uma situação adversa (GARTSIDE *et al.*, 2003). Estudos mostram que ratos adultos que foram submetidos ao estresse induzido por uma breve separação materna, depois do nascimento, apresentaram uma alteração da atividade exploratória quando avaliados no teste de campo aberto (MUNEOKA *et al.*, 1994).

1.4 Tratamento farmacológico da depressão

Os fármacos antidepressivos são substâncias que possuem em comum a propriedade de aliviar sintomas de depressão em seres humanos (STAHL, 2008; APA, 2014).

O tratamento da depressão atualmente se baseia no uso de fármacos que modulam a disponibilidade de NE, 5-HT e, em menor extensão, de DA nas sinapses centrais. Essa modulação pode ocorrer por intermédio de três mecanismos de ação: (1) inibição da enzima monoamina oxidase (MAO) que metaboliza as monoaminas nos terminais nervosos; (2) bloqueio de proteínas transportadoras pré-sinápticas de monoaminas que removem os neurotransmissores liberados na fenda sináptica e (3) interação com receptores pré- ou pós-sinápticos reguladores da liberação das monoaminas (NEMEROFF; OWENS, 2002; BRUNTON, CHABNER; KNOLLMANN, 2017) (figura 6).

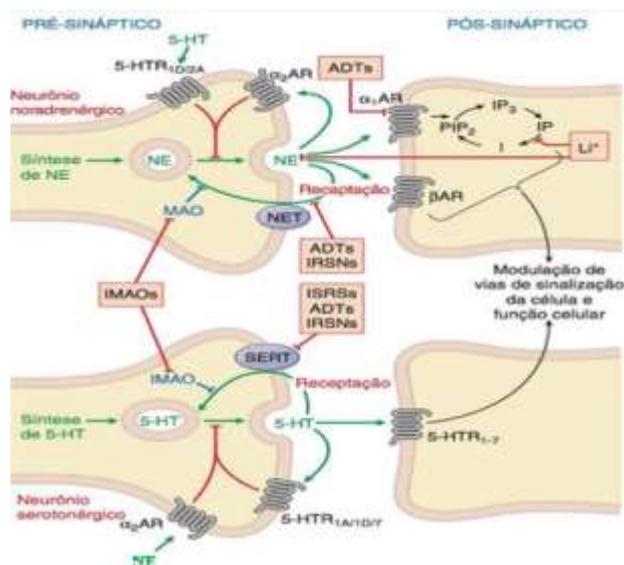
Um aumento na neurotransmissão de 5-HT e NE pode ser propiciado por meio do bloqueio dos transportadores de 5-HT (SERT) e de NE (NET) pelos fármacos denominados inibidores da recaptação de NE e 5-HT (IRSNs), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) e pelos antidepressivos tricíclicos (ADTs). A inibição da metabolização de NE e 5-HT proporciona um aumento nos níveis sinápticos desses neurotransmissores pelos inibidores da MAO (IMAOs) (RANG *et al.*, 2016). No tocante à DA, o fármaco bupropiona, através do bloqueio de DA (DAT), aumenta os níveis sinápticos de DA, resultando em uma melhora na neurotransmissão dopaminérgica (FOLEY; DESANTY; KAST, 2006).

Cabe ressaltar que o tratamento duradouro com esses fármacos antidepressivos pode levar a efeitos tardios, tal como a dessensibilização de receptores que induz alterações de longa duração na neurotransmissão monoaminérgica. Ademais, a relação existente entre os sistemas de neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica pode promover uma modulação efetiva interdependente entre os dois sistemas (O'DONNELL; SHELTON, 2012).

Diversos fármacos que atuam sobre a recaptação e a liberação de noradrenalina foram largamente utilizados no tratamento da depressão, no entanto, uma parcela de pacientes não respondia satisfatoriamente a esses agentes farmacológicos, em virtude dos diversos efeitos colaterais, como alterações na

condução do potencial de ação cardíaco, antagonismo dos receptores histaminérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos (O'DONNELL; SHELTON, 2012; RANG *et al.*, 2016).

Figura 6: Locais de ação dos antidepressivos



Fonte: Adaptado de BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN. Goodman & Gilman: 2017.

Para minimizar os efeitos não terapêuticos dos antidepressivos tricíclicos, surgiram os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) que apresentam a mesma eficiência, contudo, não são cardiotoxicos e não apresentam afinidade por receptores histaminérgicos, adrenérgicos e dopaminérgicos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2017). Entretanto, uma alteração no metabolismo da indolamina, que altera a biodisponibilidade da serotonina, favorece a ativação simpática e a liberação de cortisol pelas glândulas adrenais, o que pode levar à ansiedade (RICHELSON, 2001). Faz-se necessário salientar que os inibidores da recaptação de monoaminas podem provocar, dentre outros efeitos adversos, náusea, anorexia, insônia, perda da libido e friidez e, quando usados em combinação com IMAOs, podem causar a “síndrome da serotonina”, caracterizada por tremores, hipertermia e colapso cardiovascular, podendo levar à morte (RANG *et al.*, 2016; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2017).

Cabe ainda frisar que todos os antidepressivos, em uso atualmente, possuem algumas limitações quanto a sua eficácia. Aproximadamente 40% dos pacientes podem ser refratários ao tratamento, independentemente da adesão ao tratamento, isto é, utilização de doses adequadas. Além disso, ainda existe um gap de aproximadamente duas semanas para se obter uma resposta terapêutica esperada (NEMEROFF; OWENS, 2002; O'DONNELL; SHELTON, 2012; BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2017).

Além disso, o tratamento farmacológico da depressão é oneroso e, geralmente, perdura por meses. Em 2011, o mercado mundial de antidepressivos chegou a US\$ 7 bilhões anualmente e, apenas no Brasil, houve um gasto de US\$ 133 milhões/ano (GONÇALVES, 2011). Em 2016, um estudo demonstrou que houve um salto de 74% no consumo de antidepressivos em seis anos (2010-2016) no Brasil (MORAES, 2017). Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos que possam atuar com menos efeitos colaterais e de forma mais seletiva, eficaz e rápida.

1.5 Plantas medicinais e a depressão

O uso de plantas medicinais com efeitos psicotrópicos tem sido registrado no mundo inteiro. Neste sentido, estudos descrevem a atividade antidepressiva de inúmeras espécies de plantas, como a *Abelmoschus manihot* (GUO *et al.*, 2011), *Hemerocallis citrina* (GU *et al.*, 2012), *Annona cherimólia* (MARTÍNEZ-VÁSQUEZ *et al.*, 2012), *Hypericum perforatum* (ALVES *et al.*, 2014), *Litsea glaucescens* (GUZMÁN-GUTIÉRREZ *et al.*, 2015) e a *Eugenia brasiliensis* Lam (COLLA *et al.*, 2012). Alguns componentes ativos têm sido identificados (CARLINI, 2003; ZENI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2014; GUZMÁN-GUTIÉRREZ *et al.*, 2015), como por exemplo, os compostos ativos hipericina e hiperforina (ALVES *et al.*, 2014) da planta *Hypericum perforatum* (erva-de-São-João). Estudos sobre os possíveis mecanismos de ação dos compostos ativos hipericina e hiperforina mostram uma modulação do sistema monoaminérgico (BILIA; GALLORI; VINCIERI, 2002; WURGLICS; SCHUBERT-ZSILAVECZ, 2006).

As plantas têm sido uma importante fonte de ingredientes terapêuticos, muitos dos quais se estabeleceram como protótipos para a síntese de grande número de fármacos (CALIXTO, 2005). Por isso, na busca de novos fármacos e compostos com atividade terapêutica, as plantas medicinais tornaram-se um insumo de grande importância para as indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa (EVANS, 1996). Dessa forma, a procura por novos compostos isolados de plantas com ação farmacológica no SNC tem aumentado muito nas últimas décadas. Por consequência, várias formulações farmacêuticas contendo extratos de plantas têm sido usadas na melhora da cognição, ou como ansiolíticos, ou ainda como antidepressivos. Cabe ressaltar que, depois de numerosos ensaios clínicos randomizados e controlados e testes de eficácia e segurança, algumas dessas formulações foram introduzidas na prática clínica (LINDE *et al.*, 2011, 2015). Estima-se que cerca de 25% dos fármacos atualmente disponíveis foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de plantas medicinais (WACHTEL-GALOR; BENZIE, 2011).

Contudo, no tocante às plantas da flora brasileira, carece-se ainda de muitos estudos para caracterização de inúmeras plantas como medicinais, visto que o Brasil é o país que possui a maior flora existente e biodiversidade em seu meio ambiente (OLIVEIRA; GILBERT, 2015).

1.6 Extrato Hidroalcoólico do caroço da *Euterpe Oleracea* Mart.

A *Euterpe oleracea* Mart., popularmente conhecida como açazeiro é uma palmácea pertencente à família *Aracaceae*, e nativa da região Amazônica do Brasil, sendo encontrada principalmente nos Estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá (MUÑIZ-MIRET *et al.*, 1996). O açazeiro atinge de 2 a 30 metros de altura e possui folhas longas e segmentadas, flores em espiga e múltiplas hastes (que suportam em torno de 3 a 8 cachos de frutos com aproximadamente 900 frutos por cacho), (CAMPOS; BOVI; IADEROZA, 1991, 1991; SANTOS, 2015) (Figura 8A).

Os frutos de açai são de cor roxa a preta e de tamanho pequeno, possuindo em torno de 1-1,5 cm de diâmetro. Além da pequena quantidade de polpa, o açai contém uma semente (um caroço) que corresponde a cerca de 85% do tamanho do fruto (STRUDWICK; SOBEL, 1988; PESSOA; Da SILVA; SILVA, 2007) (Figura 7B). A polpa do fruto de açai é comumente consumida pelos povos nativos e da zona rural (GOULDING; SMITH, 2007). Essas populações têm atribuído ao fruto de açai, a casca do tronco e as folhas da palmeira do açai, vários efeitos benéficos tais como, nas discrasias sanguíneas, distúrbios do trato gastrointestinal, dor e febre (MATHEUS *et al.*, 2007). Hoje em dia, com a ascensão da comercialização nacional e internacional do açai, o fruto vem sendo usado na produção de inúmeros produtos alimentícios, como alimentos e bebidas à base de açai (COISSON *et al.*, 2005; SILVA, 2008).

Estudos químicos têm mostrado que o açai é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo) e outros polifenóis como (-) epicatequinas, (+) catequinas homo-orientina, orientina, isovitexina e taxifolina deoxihexose (BOBBIO *et al.*, 2000; POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; GALLORI *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2006; GARZÓN *et al.*, 2017).

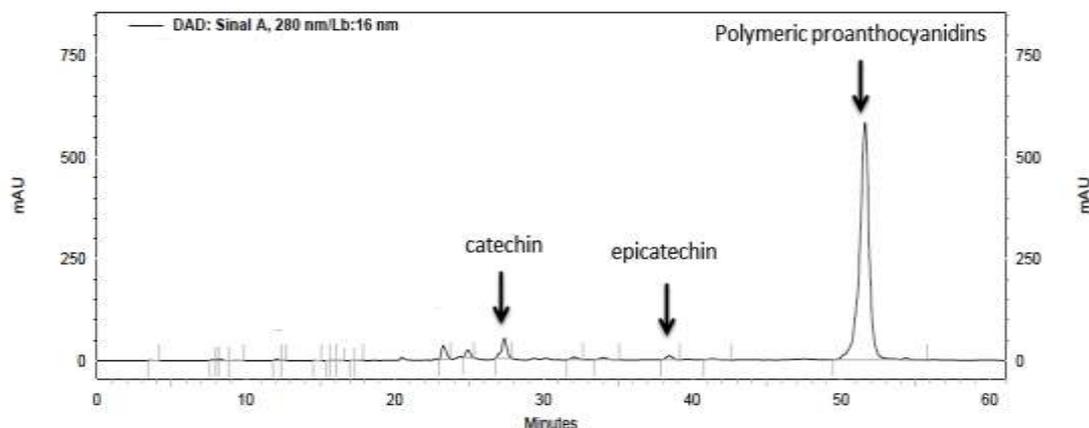
Figura 7: Ilustrações da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). (A) Palmeira com cachos contendo o fruto; (B) frutos drupáceos maduros de açaí colhidos.



Fonte: (A) Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/amapa/busca-de-imagens/-/midia/3630003/acaizeiro-em-produção> “Acesso em 10 abr. 2018”; (B) Disponível em: <https://alfonsin.com.br/agricultores-familiares-tm-desconto-em-17-produtos/> “Acesso em 10 abr. 2018”.

Estudos pioneiros realizados pelo nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcolóico do caroço do açaí (ASE), uma parte habitualmente negligenciada do fruto é rico em catequina, epicatequina e procianidinas poliméricas (figura 8), apresentando conteúdo polifenólico mais expressivo que a polpa, e ainda uma ação vasodilatadora mais intensa do que a obtida com o extrato de polpa de açaí (ROCHA *et al.*, 2007).

Figura 8- Análise por HPLC do ASE.



Legenda: Os picos destacados nos tempos de eluição de 27, 38 e 51 min correspondem a catequina, epicatequina e taninos condensados oligoméricos e poliméricos, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2015)

Nos últimos anos, as propriedades farmacológicas do ASE, rico em polifenóis, vêm sendo estudadas pelo nosso grupo e um significativo efeito vasodilatador dependente de endotélio (ROCHA *et al.*, 2007) foi observado. O ASE induz efeitos anti-hipertensivo, antioxidante (ROCHA *et al.*, 2008; DA COSTA, 2012; de BEM *et al.*, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2015), assim como efeitos anti-hiperglicêmico (de OLIVEIRA *et al.*, 2010,; de BEM *et al.*, 2017), hipolipidêmico (de OLIVEIRA *et al.*, 2010; 2015) e antiinflamatório (SOARES de MOURA *et al.*, 2012).

Os múltiplos efeitos do ASE no sistema cardiovascular e metabólico, bem como sua ação na fome e na saciedade (DE OLIVEIRA, 2010, 2015), sugerem que o extrato pode ter alguma atuação no Sistema Nervoso Central, interferindo de forma indireta ou direta na ação de neuropeptídeos, como a NE e CRH, e possivelmente apresentar alguma atividade antidepressiva. A hipótese de uma ação central do ASE é reforçada por evidências recentes observadas pelo nosso grupo, que revelaram uma importante ação antinociceptiva em modelos experimentais de dor neuropática, com eficácia similar à amitriptilina (Sudo *et al.*, 2015). Seu mecanismo de ação ainda não está claro, mas pode agir na modulação opióide, catecolaminérgica e pode atuar indiretamente via NO (SUDO *et al.*, 2015).

Outrossim, o ASE tem ação sobre a resistência insulínica, o que pode desempenhar um papel importante na memória (de OLIVEIRA *et al.*, 2010; 2015), uma vez que um estudo recente demonstrou que a resistência insulínica tem papel

importante na demência (LOURENCO *et al.*, 2013). Outro estudo, desenvolvido por Wong *et al.* (2013), utilizando modelo experimental para doença de Alzheimer *in vitro*, demonstrou que o suco de açaí apresenta importante efeito neuroprotetor em células PC12, inibindo a formação de fibrilas e agregados amiloides, bem como protegendo as células contra a exposição a β -amiloide 1-42. Recentemente, o flavonóide apigenina encontrado no açaí foi identificado como uma biomolécula neuroprotetora contra a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e a lesão isquêmica (MACHADO *et al.*, 2016).

Além disso, um estudo recente descreveu a eficácia do suco de açaí na redução de convulsões induzidas quimicamente por um agente convulsivante, o antagonista do GABA, pentilenotetrazol (SOUZA-MONTEIRO *et al.*, 2015). Portanto, esses dados em conjunto, sugerem que as moléculas ativas do fruto da *Euterpe Oleracea* Mart. devem possuir um potencial efeito neuroprotetor contra a progressão de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, Parkinson e a epilepsia. Dessa forma, sugere-se que o açaí pode apresentar relevantes atividades protetoras ao organismo possivelmente atuando contra doenças neuropsiquiátricas como a depressão.

Estudos recentes têm sugerido uma conexão entre o consumo de frutos e as alterações relacionadas com a idade na cognição e no funcionamento neuronal. Frutos contendo componentes polifenólicos, tais como flavonoides, parecem mitigar déficits cognitivos relacionados com a idade, através de mecanismos antioxidantes e anti-inflamatório ou via efeitos diretos no cérebro (CAREY *et al.*, 2017). Estudos envolvendo ratos idosos demonstraram a capacidade de frutos ricos em polifenóis (por exemplo, blueberry, strawberry, uvas Concord, etc.) em reverter ou aliviar os déficits relacionados à idade no que diz respeito às tarefas cognitivas, incluindo as que requerem o uso de memória e aprendizagem espaciais (MALIN DH *et al.*, 2011; SHUKITT-HALE B, 2006; SHUKITT-HALE *et al.*, 2009). Em um estudo comparativo entre *Euterpe oleracea* e a *Euterpe precatoria*, Carey *et al.* (2017) demonstraram que apenas a suplementação dietética com *Euterpe oleracea* foi associada a uma melhora, tanto na memória de referência quanto na memória de trabalho, em ratos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris (CAREY *et al.*, 2017), apesar da *Euterpe precatória* apresentar maior conteúdo polifenólico (ODENDAAL, 2014; POULOSE, 2014).

Esses achados como um todo sugerem um importante potencial do ASE, como uma planta medicinal, com propriedades farmacológicas úteis para um possível uso terapêutico no tratamento de doenças cardiometabólicas, assim como, as que afetam o SNC. Baseando-se nas evidências recentes de uma possível ação neuroprotetora da *Euterpe oleracea*, acreditamos que o ASE possa desempenhar um efeito relevante no SNC, com benefícios sobre a depressão.

Portanto, com base nesses achados e dos estudos do nosso grupo que sugerem uma possível ação central do ASE, torna-se importante avaliar possíveis efeitos benéficos do ASE sobre a depressão.

2 OBJETIVO DO ESTUDO

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho visa avaliar a ação antidepressiva do ASE (extrato hidroalcoólico de caroço de açaí) em ratos Wistar adultos submetidos à Separação materna única (SMU) ou crônica (SMC) e não submetidos a nenhuma separação (controles - CON), através de suas ações sobre parâmetros comportamentais, moleculares e bioquímicos.

2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos o presente trabalho visa avaliar:

- ✓ O tempo de imobilidade (teste de Porsolt) dos ratos tratados ou não com ASE ou Fluoxetina;
- ✓ A atividade locomotora (teste de campo aberto) de ratos tratados ou não com ASE ou Fluoxetina;
- ✓ A expressão das proteínas BDNF, pró-BDNF, GR, PDE5, PPAR- γ (no hipocampo) e das proteínas GR, PDE5 e PPAR- γ (no hipotálamo);
- ✓ A peroxidação lipídica (MDA), a carbonilação de proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes, SOD, catalase e GPx em homogenato do tronco encefálico;
- ✓ A produção de NO em homogenato do tronco encefálico;
- ✓ Medida das proteínas TrkB (homogenato do hipotálamo), GR e CRH (plasma);
- ✓ Medida das catecolaminas NA e DA (glândula adrenal).

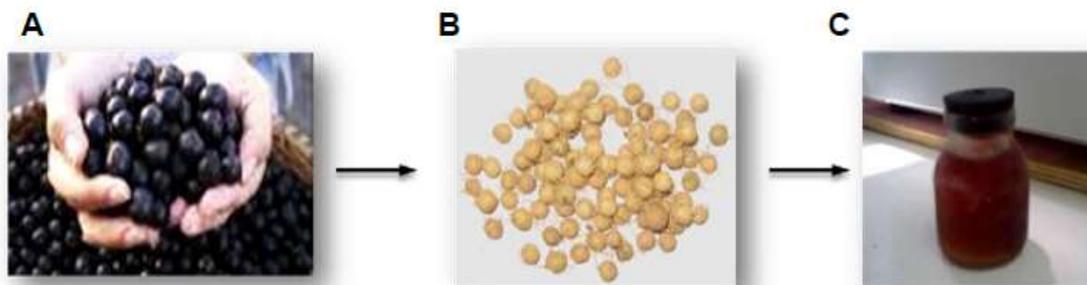
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos descritos a seguir, foram previamente aprovados, pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA/069/2012), que segue as diretrizes adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a Lei n 11.794, sancionada em 2008. Todos os experimentos foram realizados para minimizar o número de ratos e, o sofrimento causado pelos procedimentos.

3.1. Preparo do extrato hidroalcoólico do caroço da *Euterpe oleracea Mart.*

Utilizamos frutos da planta *Euterpe oleracea Mart.* (açai), provenientes de Belém, fornecidos pelo nosso colaborador Professor Dr. Pergentino José Cunha Souza, docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará. Após a lavagem dos frutos, aproximadamente 200 g de caroço foram separados, triturados, embebidos em 400 mL de água destilada e então fervidos por cinco minutos. Imediatamente após a fervura acrescentou-se 400 mL de etanol. O extrato hidroalcoólico foi guardado em geladeira e agitado periodicamente por 2 a 4 h ao longo de 10 dias. Ao final deste período, o extrato foi filtrado em papel de filtro tipo xarope e posteriormente em papel de filtro tipo Whatman número 1. Posteriormente, todo o etanol foi evaporado à baixa pressão na temperatura de 50° a 60°C. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20°C até o uso (Rocha *et al.*, 2007) (Figura 9). Após o preparo de todos os extratos, o conteúdo de polifenóis foi medido por Folin Ciocalteau, assim como, o seu potencial vasodilator verificado através da reatividade vascular, essas medidas são utilizadas como controle de qualidade e viabilidade do extrato para a posterior utilização. A dose tóxica de administração do ASE é a partir de 1,5 g/kg (dados não publicados).

Figura 9. Processamento do extrato hidro-alcoólico do caroço de açaí (ASE). (A) Fruto do açaí; (B) Caroço do açaí; (C) Extrato pronto, já evaporado e liofilizado, diluído em H₂O destilada [100 mg/mL].



Fonte: DA COSTA, 2012.

3.2. Animais

Ratas Wistar nulíparas normotensas com três meses de idade (250-300g) de nossa própria colônia foram usadas. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, com acesso livre à comida e água potável *ad libitum*, em uma sala sob controle ambiental: ciclo claro-escuro (12h claro/ 12 h escuro; claridade das 6:00 às 18h), com temperatura em torno de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$; por um período de aclimatização de pelo menos duas semanas. Após esse período, durante o acasalamento as ratas foram mantidas em gaiola padrão de laboratório (39 cm comprimento x 32 cm largura x 16 cm altura) e acasaladas na proporção de três fêmeas para um macho. Após a constatação da gravidez, as fêmeas grávidas foram separadas em gaiolas individuais (29 cm comprimento x 18 cm largura x 12 cm altura), e observadas diariamente para a monitorização do nascimento dos filhotes. As ninhadas selecionadas para uso nos experimentos foram provenientes de mães que tiveram entre 8 a 12 filhotes com o objetivo de tornar mais homogêneo o aleitamento e o padrão de cuidado dos filhotes. No dia do nascimento dos filhotes, os animais excedentes foram excluídos do estudo e cada rata amamentou somente oito (8) filhotes (concordando com o número de mamilos) e os filhotes (machos e fêmeas) foram mantidos juntos durante todo o experimento, em gaiolas (39cm comprimento x 32cm largura x 16cm altura). Os filhotes foram submetidos à separação materna única (SMU), sofreram a separação no dia seguinte ao nascimento (PN 2). Os filhotes que

foram submetidos à separação materna crônica (SMC), sofreram a separação no dia PN2 durante 3 semanas por um período de 3 horas. Em PN21 os filhotes foram separados das progenitoras, sendo mantidos na mesma caixa até completarem a idade de PN30 (início da adolescência) (Adriani et al., 2002). Desta data em diante, os animais foram separados por sexo em gaiolas com no mínimo 2 e no máximo 4 animais, sempre do mesmo sexo. Durante todo o período experimental, nenhum animal ficou sozinho em gaiola no biotério. Neste estudo, usamos apenas os animais machos como objeto de estudo.

3.2.1 Delineamento experimental

Noventa e cinco (95) ninhadas foram utilizadas neste estudo. Após o desmame, cada animal foi identificado, marcado no rabo com caneta de tinta atóxica e alocado em gaiola com três outros animais, com todo controle das ninhadas, identificando todos os irmãos.

Todos os animais começaram a ser tratados a partir do dia PN76, e a partir do dia PN106 os testes comportamentais iniciaram-se.

Dessa forma, trabalhamos com os seguintes grupos experimentais:

- 1) Grupo Controle (CON) (água; por gavagem);
- 2) CON+ASE (200 mg/Kg/dia; por gavagem);
- 3) CON+FLU (10mg/Kg; por gavagem);
- 4) SMU (água; por gavagem);
- 5) SMU+ASE (200 mg/Kg/dia; por gavagem);
- 6) SMU+FLU: (10mg/Kg; por gavagem);
- 7) SMC (água; por gavagem);
- 8) SMC+ASE (200 mg/Kg/dia; por gavagem);
- 9) SMC+FLU (10mg/Kg; por gavagem).

Os grupos tratados com ASE ou fluoxetina receberam o tratamento por gavagem. Assim, os animais dos grupos controle (CON), SMU e SMC também foram submetidos ao procedimento de gavagem com a água destilada, veículo dos tratamentos, para mimetizar o mesmo estresse dos demais. O período de tratamento iniciou-se a partir do dia PN106 e se estendeu até o dia PN116.

Todos os animais foram submetidos aos testes de Porsolt e *Open field*. Ao final de todos os testes comportamentais os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tecidos de interesse (hipocampo, tronco-encefálico, glândula adrenal e sangue) foram coletados para análises posteriores. Ao todo foram utilizados 22 animais do grupo CON, 17 animais do grupo ASE, 28 animais do grupo FLU, 14 animais do grupo SMU, 13 animais do grupo SMU+ASE, 16 animais do grupo SMU+FLU, 15 animais do grupo SMC, 13 animais do grupo SMC+ASE e 17 animais do grupo SMC+FLU.

3.2.2 Separação Materna Única e Crônica

No segundo dia após o nascimento, os filhotes foram removidos das mães e colocados em uma nova gaiola sem maravalha em outra sala à temperatura de 22°C. Toda prole fêmea foi excluída do estudo e cada rata amamentou somente oito (8) filhotes machos. Os procedimentos de separação que representam o estresse pós-natal consistiram em: (a) separação materna única (SMU), com uma duração de oito minutos e em seguida os filhotes foram devolvidos a sua gaiola de origem para suas respectivas mães e (b) separação materna crônica (SMC), com uma duração de três horas e em seguida os filhotes foram devolvidos a sua gaiola de origem para suas respectivas mães, por um período de 3 semanas.

3.3 **Testes de comportamento**

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram submetidos a testes comportamentais, a partir do PN106. Todos os testes foram filmados e analisados posteriormente. Antes dos testes comportamentais serem iniciados, os animais foram levados à sala de testes, permanecendo por 15 minutos, a fim de promover uma aclimação no local da sala de testes, objetivando assim o comprometimento das análises comportamentais. No momento do teste, o animal é colocado no

equipamento e permanece sozinho na sala. Após cada teste, o animal era retirado do equipamento, o qual era limpo com papel toalha e álcool etílico hidratado 70 °GL para remover urina, fezes e odores deixados pelo animal avaliado. Os testes eram realizados sempre no período da manhã e no período da tarde; foi efetuado apenas um tipo de teste por dia. Foram utilizados protocolos de testes comportamentais para controle dos testes realizados e identificação do animal testado, contendo neste protocolo informações, tais como dia e horário da realização de cada teste (ANEXO 1). Os testes realizados por cada animal foram filmados, utilizando para isso câmera filmadora Sony Standard Definition DCR-PJ6 (Preta com LCD de 2,7", Zoom Óptico 70x, Estabilizador de Imagem, Projetor Integrado 60' + Cartão de 16GB). As análises dos vídeos foram realizadas pelo pesquisador através do programa ACC PlusM 102 Avaliação Computadorizada de Comportamento, desenvolvido no laboratório de neurofisiologia (DCF/IBRAG/UERJ). Para avaliação do teste de ansiedade e do teste de Porsolt foi utilizado: ACC PlusM 102 e Anl Plus M Ext 102, e para o teste de busca por novos estímulos: ACC OpF HB Rat e Anl OpF HB Rat Ext, possibilitando assim a transformação de dados qualitativos em dados quantitativos.

3.3.1 Teste do campo aberto

O modelo consiste em colocar os animais para se locomoverem livremente, individualmente, no centro de uma caixa quadrada de madeira (72cm x 72cm, 40cm de altura), dividida em 16 quadrantes (18cm x 18cm), por um período de 5 min. Durante esse período, são contados os números de cruzamentos que o animal faz entre os quadrantes, sendo que cada cruzamento só é contado quando o animal atravessa com as quatro patas de um quadrante para o outro. O número de cruzamentos realizado por cada animal nesse período serviu como índice de sua atividade locomotora.

3.3.2 Teste do nado forçado (teste de Porsolt)

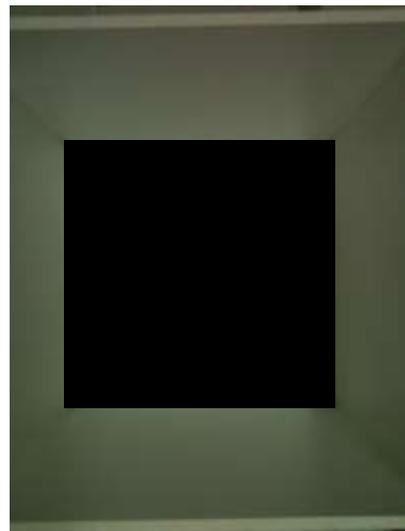
O Teste de Porsolt consiste em submeter os animais a uma sessão de nado forçado de 15 minutos (pré- teste), seguido por uma sessão de 5 minutos (teste) depois de 24 horas (MEZADRI *et al.*, 2010) (Figura 10). Para a realização do nado, os animais foram colocados individualmente em um cilindro (altura=40 cm; diâmetro=15cm) contendo 20 cm de água na temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ de onde não conseguiam escapar e nem se apoiar no fundo do cilindro. A variável analisada é o tempo de imobilidade. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água.

Figura 10 - Vista lateral do teste de Porsolt; Rato com postura típica de imobilidade



Fonte: O autor, 2018.

Figura 11 - Vista superior do campo aberto



Fonte: O autor, 2018.

Os animais, um por vez, foram colocados numa esquina do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE) foi registrado durante um tempo de 5 minutos (figura 11). As variáveis registradas foram: o tempo gasto na periferia (locomoção periférica) e o tempo gasto na área central (locomoção central).

3.4. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

O hipotálamo e o hipocampo foram homogeneizados em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 µl de coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugados três vezes (13000 rpm, 4°C por 25 min).

A concentração proteica foi determinada usando ensaio colorimétrico do kit BCA Protein Assay (ThermoScientific Inc., Barrington, IL, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (Tris-HCl 50 mM, pH: 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 5 min. Em seguida, as amostras foram analisadas em condição desnaturante por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram aplicados 20 µg de proteína do homogenato em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação, de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em T-TBS acrescido de albumina a 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (overnight, a 5°C): anti-BDNF (1:1000), anti-GR (1:1000), anti-PDE5 (1:1000) e anti-PPAR-γ (1:1000). O anticorpo constitutivo utilizado para todas as membranas foi o anti-β actina (1:500) (Anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:1000) por 40 minutos (25°C) sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas e incubadas com estreptavidina (1:1000), por 40 minutos sob agitação constante. As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas com kit de quimioluminescência (ECL-plus; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS de imagens moleculares (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Adobe Photoshop Elements 11, versão: 11.0 (Adobe Systems Incorporated).

3.5. Determinação por Imunoensaio enzimático (Elisa)

A determinação da concentração plasmática do CRH e do GR foi realizada através dos kits comerciais “Rat CRH (Corticotropin Releasing Hormone) ELISA Kit, Catalog No : E-EL-R0270” e “Rat GR(Glucocorticoid Receptor) ELISA Kit, Catalog number:E-EL-R0422” da ELABSCIENCE, segundo as instruções do fabricante.

A determinação quantitativa da concentração do TrkB foi feita a partir do homogenato do hipotálamo e foi realizada através do kit comercial “Rat TRKB (Tyrosine receptor kinase B) ELISA Kit, Catalog No: MBS2512413” da MyBioSource, segundo as instruções do fabricante.

A determinação das catecolaminas NA e DA foi feita a partir do homogenato da glândula adrenal e foi realizada através do kit comercial “3-CAT (Research) ELISA, Catalog no: IB89156”, seguindo as instruções do fabricante.

3.6 Ensaio pró-oxidantes

3.6.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta

padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper e Hadley (1990) e adaptada para medida em plasma.

Foram utilizados 200 μL de homogenato de tronco encefálico para 400 μL de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por dez min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 500 μL do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500 μL de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por trinta minutos. Deixou-se esfriar por cinco minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.6.2 Carbonilação de Proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos de proteínas, (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado por espectrofotometria em 370 nm usando um coeficiente 22.0000 molar⁻¹em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

Foram utilizados 100 μL de homogenato de tronco encefálico em duplicata. Foram realizadas lavagens com solução de TCA 10% e etanol-acetato de etila. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 2 min a 2000 rpm, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCl 2 M por 1. Em seguida, adicionou-se a solução de TCA 10% , sendo as amostras posteriormente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6 M, centrifugadas por 3 min a 5000 rpm e foi realizada a leitura da absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro (370 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.7 Atividades das enzimas antioxidantes

A medida da atividade das enzimas antioxidantes superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), foi realizada em homogenato de tronco encefálico preparados com tampão fosfato (NaCl 5,84 g, NaH₂PO₄ 13,8 g, Na₂HPO₄ 26,8 g, KCl 7,45 g, EDTA 2,28 g) em pH: 7,4.

3.7.1 Medida da Superóxido Dismutase

O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o H₂O₂ que deve ser retirado do meio o mais rápido possível. Uma unidade de enzima é definida pela quantidade transformada em 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi estimada pela inibição da autooxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm). A adrenalina é oxidada pelo O₂⁻ para formar um produto róseo, adrenocromo. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Bannister e cols. (1987) e adaptada para o tecido encefálico.

Foram utilizados 20, 40 e 60 µL de cada amostra de homogenato de tronco encefálico em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1940 µL de tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada) e 60 µL de noradrenalina (19 mg/mL de água destilada). Também foram adicionados 20 µL da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o peróxido de hidrogênio formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida espectrofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de cento e oitenta segundos.

Para o cálculo foi utilizado o alfa da reta de cada amostra em todas as concentrações utilizadas em planilha do excel. Os resultados foram ponderados em mg de proteína.

3.7.2 Medida da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 . Na reação, uma das moléculas de H_2O_2 é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água. Este método mede a atividade da enzima produzida pelas células e organelas em resposta a quantidade de H_2O_2 , medido pelo espectrofotômetro. A atividade da enzima, portanto, foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio pela reação.

Foram utilizados 50 μL de homogenato de tronco encefálico em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria (240 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de sessenta segundos (Aebi, 1984).

3.7.3 Medida da Glutathione Peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutathione (GSH) como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPX foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 100 μL de homogenato de tronco encefálico em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1550 μL de tampão fosfato, glutathione reduzida (2 mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, 200 μL de NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente, 200 μL de H_2O_2 (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por

espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé e Gunzler (1984) e adaptada para os tecidos estudados.

3.8 Medida de nitrito

Como o NO possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção deste radical é mensurada pela formação do nitrito (NO_2), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED), formando um composto azo estável de coloração púrpura, lido no comprimento de onda de 540 nm (Green *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 2003).

Solução 1: sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico 2,5%.

Solução 2: N-naftil-etilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5%.

Para a reação, foram adicionados 100 μL de homogenato de tronco encefálico em 50 μL da solução 1. Após um tempo de dez minutos foram adicionados 50 μL da solução 2. Após a homogeneização, a leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro ou leitor de microplacas. O resultado foi representado em μM (ou mMol)/ mg proteína.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). O programa GraphPadPrism (GraphPad Software, CA USA) foi utilizado para as análises estatísticas e para obtenção dos gráficos. Os dados foram analisados utilizando-se one-way analysis of variance (ANOVA), para comparar as diferenças entre os diferentes grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Tukey, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

Para as análises dos testes comportamentais, a análise quantitativa foi iniciada com a verificação da normalidade das distribuições das variáveis comportamentais pelo teste Kolmogorov-Smirnov para uma amostra (K-S). Tanto no teste de Porsolt como no teste de campo aberto, foi realizada uma ANOVA univariada (ANOVAu) onde o fator analisado foi GRUPO e a variável principal no teste de Porsolt foi o tempo de imobilidade e no teste de campo aberto, o tempo gasto na periferia (locomoção periférica) e o tempo gasto na área central (locomoção central). Para analisar e destacar as diferenças entre dois grupos, foi utilizado o Teste-t de Student não pareado.

5 RESULTADOS

5.1 Testes comportamentais

5.1.1 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos controles submetidos ao teste de Porsolt

Para a análise do fator GRUPO (CONTROLE, ASE, FLUOXETINA) sobre a variável “tempo de imobilidade” foi utilizada a ANOVA que demonstrou um efeito significativo de GRUPO ($p < 0,05$). O efeito de GRUPO na variável analisada está apresentado na tabela 1 abaixo:

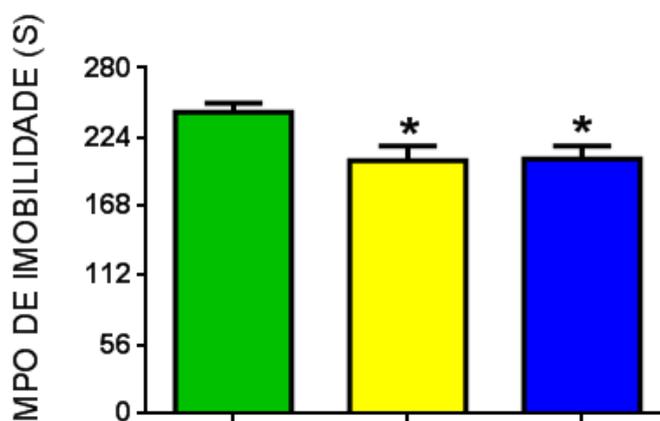
Tabela 1 - Efeito de GRUPO na variável “tempo de imobilidade” medida pelo teste de Porsolt

TESTE DE PORSOLT	Efeito GRUPO
Tempo de imobilidade	F = 4,596; gl = 2; p = 0,0185

Fonte: O autor, 2018.

Nos grupos ASE e FLU houve uma redução ($p < 0,05$) no tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (CON) (Figura 12). Contudo, o tratamento com ASE não modificou o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo FLU (Figura 12).

Figura 12 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste de Porsolt.



Legenda: Animais controles sem tratamento (CON), animais controles tratados com ASE (CON+ASE), animais controles tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos Wistar machos por grupo. Para todos os grupos $*p < 0,05$ em relação ao grupo CON, conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.2 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos submetidos à separação materna crônica no teste de Porsolt

Para a análise do fator GRUPO (CONTROLE, SMC, SMC+ASE e SMC+FLU) sobre a variável “tempo de imobilidade” foi utilizada a ANOVA_U que demonstrou um efeito significativo de GRUPO ($p < 0,05$). O efeito de GRUPO na variável analisada está apresentado na tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Efeito de GRUPO na variável “tempo de imobilidade” medida pelo teste de Porsolt em animais submetidos a SMC

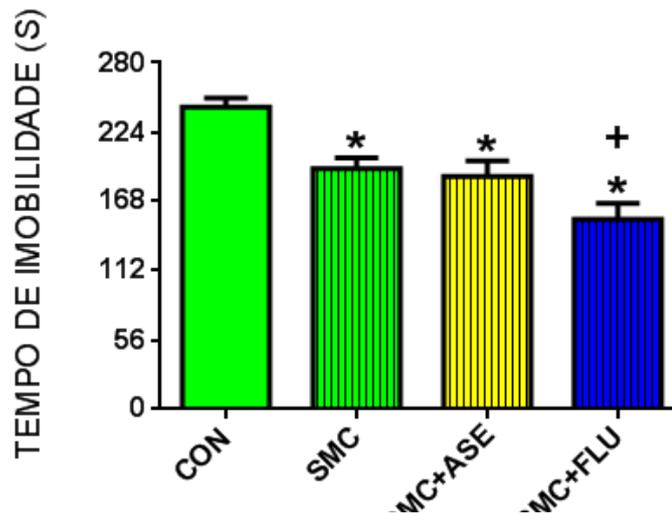
TESTE DE PORSOLT	Efeito GRUPO
Tempo de imobilidade	F = 13,55; gl = 3; p = 0,0001

Fonte: O autor, 2018.

Nos grupos SMC, SMC+ASE e SMC+FLU houve uma redução ($p < 0,05$) no tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (Figura 13).

O tratamento com a fluoxetina reduziu ($p < 0,05$) o tempo de imobilidade no grupo SMC+FLU quando comparado ao grupo SMC (Figura 13). Contudo, o tratamento com ASE não modificou o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo SMC (Figura 13).

Figura 13 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste de Porsolt.



Legenda: Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos Wistar machos por grupo. Para todos os grupos $*p < 0,05$ em relação ao grupo CON. $+p < 0,05$ em relação ao grupo SMC, conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.3 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos submetidos à separação materna única no teste de Porsolt

Para a análise do fator GRUPO (CONTROLE, SMU, SMU+ASE e SMU+FLU) sobre a variável “tempo de imobilidade” foi utilizada a ANOVA_U que demonstrou um efeito significativo de GRUPO ($p < 0,05$). O efeito de GRUPO na variável analisada está apresentado na tabela 3 abaixo:

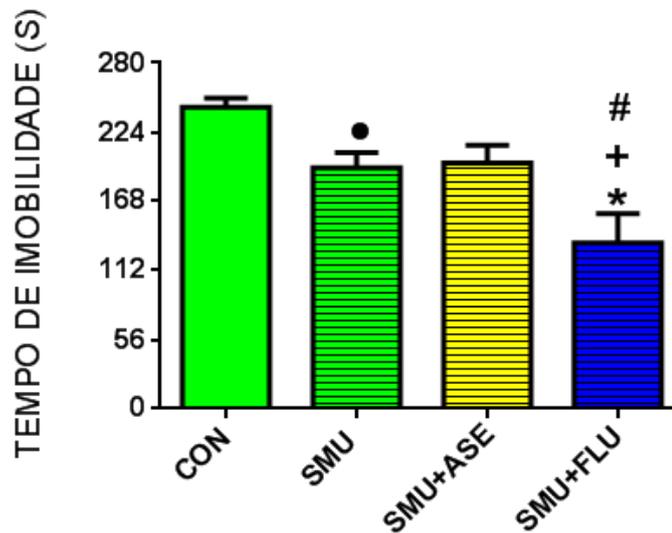
Tabela 3 - Efeito de GRUPO na variável “tempo de imobilidade” medida pelo teste de Porsolt em animais submetidos a SMU

TESTE DE PORSOLT	Efeito GRUPO
Tempo de imobilidade	F = 9, 378; gl = 3; p = 0,0001

Fonte: O autor, 2018.

No grupo SMU+FLU houve uma redução ($p < 0,05$) no tempo de imobilidade em relação aos grupos CON, SMU+ASE e SMU (Figura 14). Contudo, o tratamento com ASE não modificou o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo SMU (Figura 14). No tocante ao grupo SMU, notou-se uma redução significativa no tempo de imobilidade quando comparado com o grupo CON pelo teste T não pareado (Figura 14).

Figura 14 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste de Porsolt.



Legenda: Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna única (SMU), submetidos a separação materna única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação materna única tratados com fluoxetina (SMU + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos Wistar machos por grupo. Para todos os grupos *p<0,05 em relação ao grupo CON. +p<0,05 em relação ao grupo SMU, #p<0,05 em relação ao grupo SMC+ASE conforme determinado pelo método one-way ANOVA, •p<0,05 em relação ao grupo CON conforme determinado pelo teste T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.4 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora de ratos controles submetidos ao teste de campo aberto

Para a análise do fator GRUPO (CONTROLE, ASE, FLUOXETINA) sobre a variável principal “tempo de locomoção na periferia” ou a variável principal “tempo de locomoção no centro” foi utilizada a ANOVA que não demonstrou nenhum efeito significativo de GRUPO. O efeito de GRUPO em cada variável analisada está apresentado na tabela 4 abaixo:

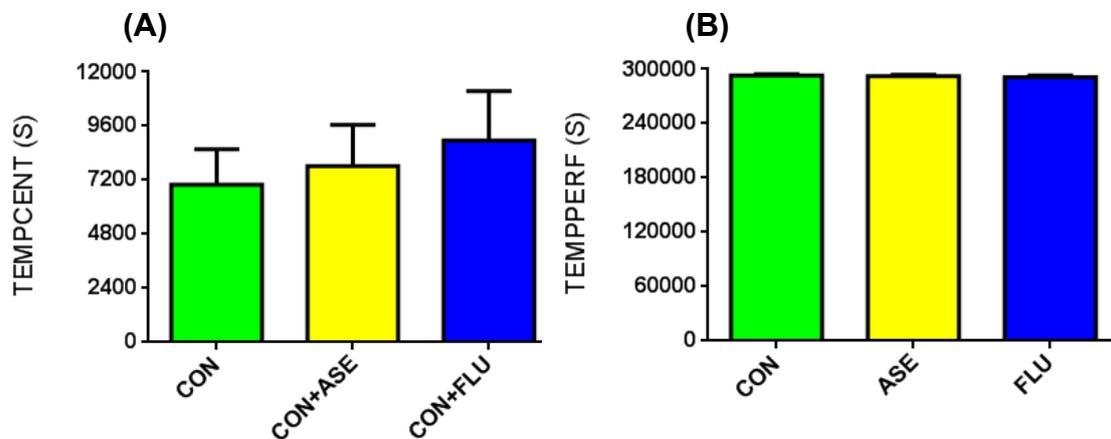
Tabela 4 - Efeito de GRUPO na variável “atividade locomotora” medida pelo teste de campo aberto em animais submetidos a SMU

TESTE DE CAMPO ABERTO	Efeito GRUPO
Tempo de locomoção na periferia	F = 0, 2922; gl = 2; p = 0,7489
Tempo de locomoção no centro	F = 0, 2922; gl = 2; p = 0,7489

Fonte: O autor, 2018.

Não foi observada diferença entre o grupo ASE e controle (CON) e nem entre o grupo FLU e controle no que diz respeito às duas variáveis tempo de locomoção na periferia e tempo de locomoção no centro (Figura 15).

Figura 15 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora em ratos submetidos ao teste de campo aberto.



Legenda: Animais controles sem tratamento (CON), animais controles tratados com ASE (ASE), animais controles tratados com fluoxetina (FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da media, n=10 ratos Wistar Machos por grupo. Os resultados são conforme determinados pelo método one-way ANOVA.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.5 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à separação materna crônica no teste de campo aberto

Para a análise do fator GRUPO [(CONTROLE, SMC, SMC+ASE, SMC+FLU) sobre a variável principal “tempo de locomoção na periferia” ou a variável principal “tempo de locomoção no centro” foi utilizada a ANOVA_U que não demonstrou nenhum efeito significativo de GRUPO. O efeito de GRUPO em cada variável analisada está apresentado na tabela 5 abaixo:

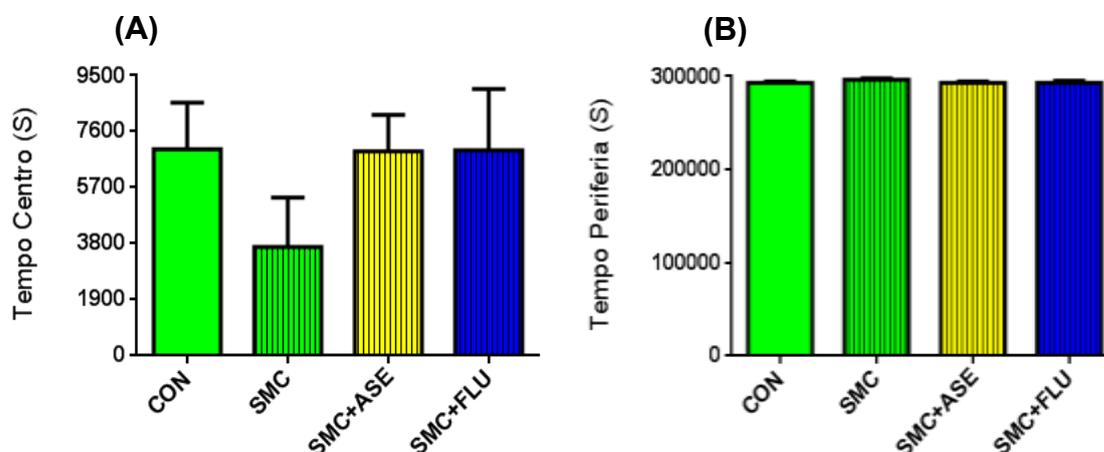
Tabela 5 - Efeito de GRUPO na variável “atividade locomotora” medida pelo teste de campo aberto em animais submetidos a SMC

TESTE DE CAMPO ABERTO	Efeito GRUPO SMC
Tempo de locomoção na periferia	F = 0, 0,9638; gl = 3; p = 0,4192
Tempo de locomoção no centro	F = 0, 2922; gl = 2; p = 0,7489

Fonte: O autor, 2018.

Não foram observadas diferenças estatísticas no tempo de locomoção no centro e na periferia da arena entre os diferentes grupos estudados (Figura 16A e 16B).

Figura 16– Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora dos ratos submetidos ao teste de campo aberto



Legenda: Tempo de permanência no centro do campo (A) e na periferia do campo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da media, n=10 Wistar machos por grupo.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.6 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à separação materna única no teste de campo aberto

Para a análise do fator GRUPO (CONTROLE, SMU, SMU+ASE, SMU+FLU) sobre a variável principal “tempo de locomoção na periferia” ou a variável principal “tempo de locomoção no centro” foi utilizada a ANOVA que não demonstrou nenhum efeito significativo de GRUPO. O efeito de GRUPO em cada variável analisada está apresentado na tabela 6 abaixo:

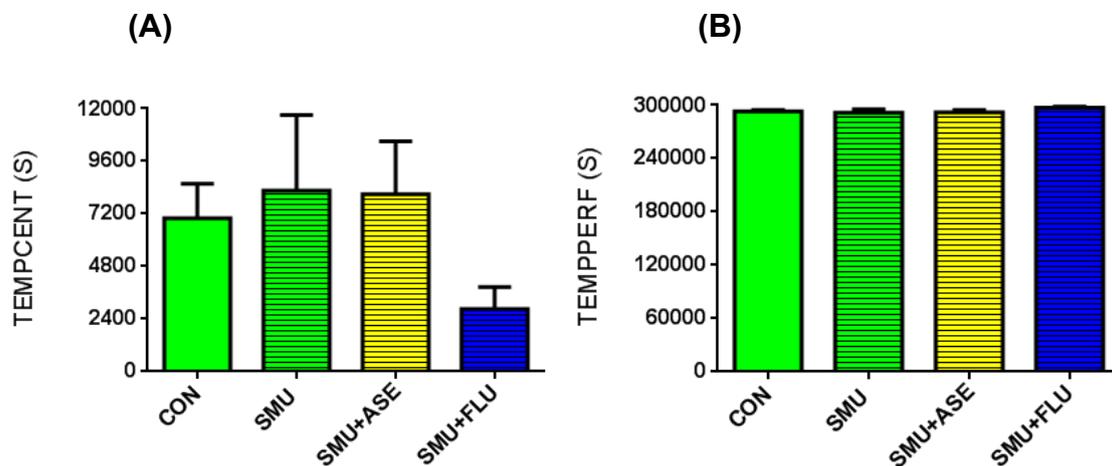
Tabela 6 - Efeito de GRUPO na variável “atividade locomotora” medida pelo teste de campo aberto em animais submetidos a SMU

TESTE DE CAMPO ABERTO	Efeito GRUPO SMU
Tempo de locomoção na periferia	F = 1, 175; gl = 3; p = 0, 3321
Tempo de locomoção no centro	F = 1, 175; gl = 3; p = 0, 3321

Fonte: O autor, 2018.

Não foram observadas diferenças estatísticas na frequência de locomoção no centro e na periferia da arena entre os diferentes grupos estudados (Figura 17A e 17B).

Figura 17 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a atividade locomotora dos ratos submetidos ao teste de campo aberto



Legenda: Tempo de permanência no centro do campo (A) e na periferia do campo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação maternal única (SMU), submetidos a separação maternal única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal única tratados com fluoxetina (SMU + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média, n=10 Wistar machos por grupo.

Fonte: O autor, 2018.

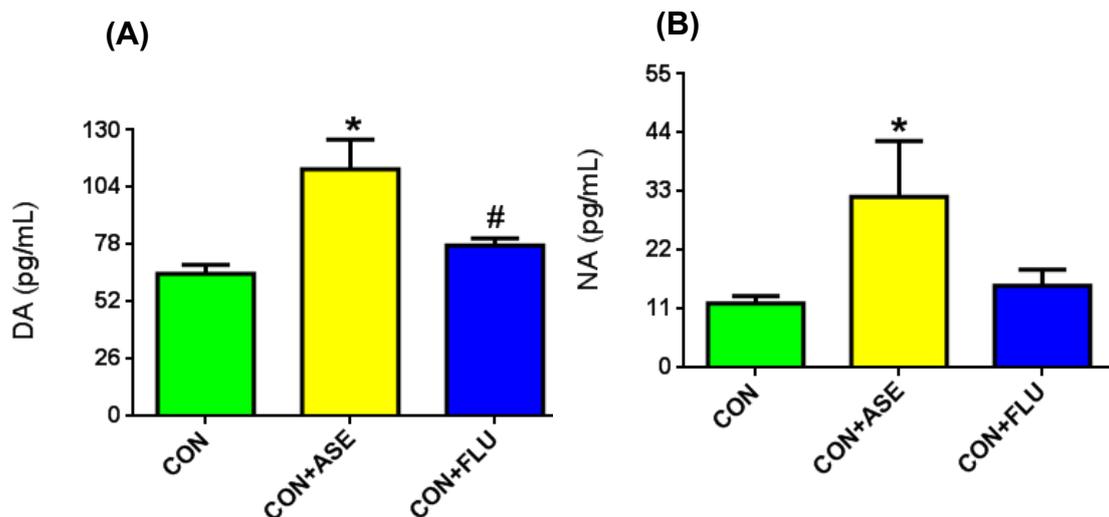
5.2 Determinação da quantificação de proteínas por ELISA

5.2.1 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos controles

Os níveis de DA em homogenato da glândula adrenal foram maiores ($p < 0,05$) no grupo tratado com ASE (CON+ASE) em relação ao grupo controle (CON) e ao grupo tratado com fluoxetina (CON+FLU) (Figura 18A). Não houve diferença entre os grupos CON+FLU e CON.

Os níveis de noradrenalina (NA) em homogenato da glândula adrenal também foram maiores ($P < 0,05$) no grupo tratado com ASE (CON+ASE) em relação ao grupo controle (CON) (Figura 18B). Não houve diferença do grupo CON+FLU em relação aos grupos CON+ASE e CON (Figura 18B).

Figura 18 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos controles



Legenda: Níveis de DA (A) e de NE (B) em homogenato da glândula adrenal. Animais controles sem tratamento (CON), animais controles tratados com ASE (CON+ASE), tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON, conforme determinado pelo método one-way ANOVA. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON+ASE; conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

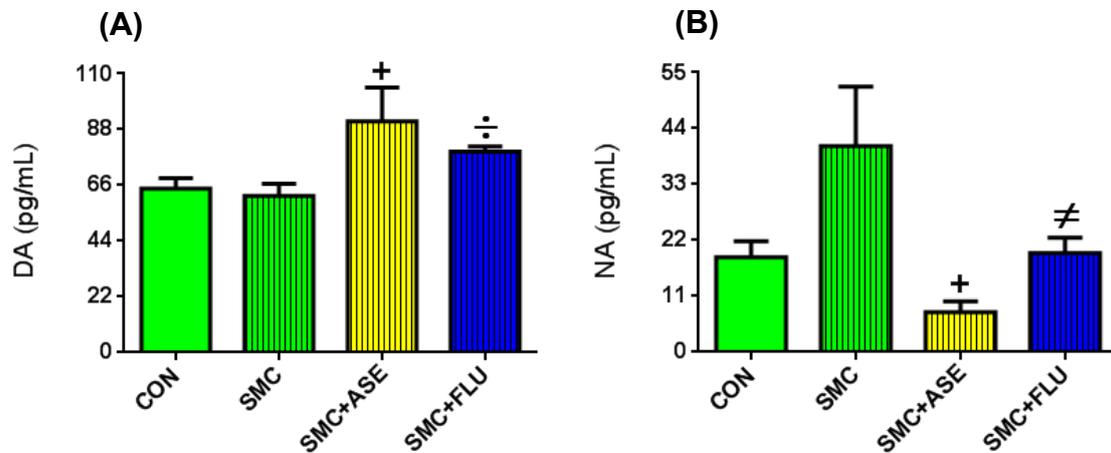
Fonte: O autor, 2018.

5.2.2 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos submetidos à separação materna crônica

Não houve diferença estatística nos níveis de DA em homogenato da glândula adrenal entre os grupos controle e SMC (Figura 19A). Todavia, o tratamento com ASE e com FLU aumentaram ($p < 0,05$) esses níveis nos grupos SMC+ASE e SMC+FLU em comparação ao grupo SMC (Figura 19A).

Também não foi observada diferença estatística nos níveis de NE em homogenato da glândula adrenal entre os grupos controle e SMC (Figura 19B). Não obstante, o tratamento com ASE reduziu ($p < 0,05$) esses níveis no grupo SMC+ASE em comparação aos grupos SMC e SMC+FLU (Figura 19B).

Figura 19 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas



Legenda: Níveis de DA (A) e de NE (B) em homogenato da glândula adrenal. Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna crônica (SMC), submetidos a separação materna crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação materna crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo SMC, conforme determinado pelo método one-way ANOVA. [≠] $p < 0,05$ em relação ao grupo SMC; $\neq p < 0,05$ em relação ao grupo SMC+ASE, conforme determinado pelo método do teste-T de Student não-pareado.

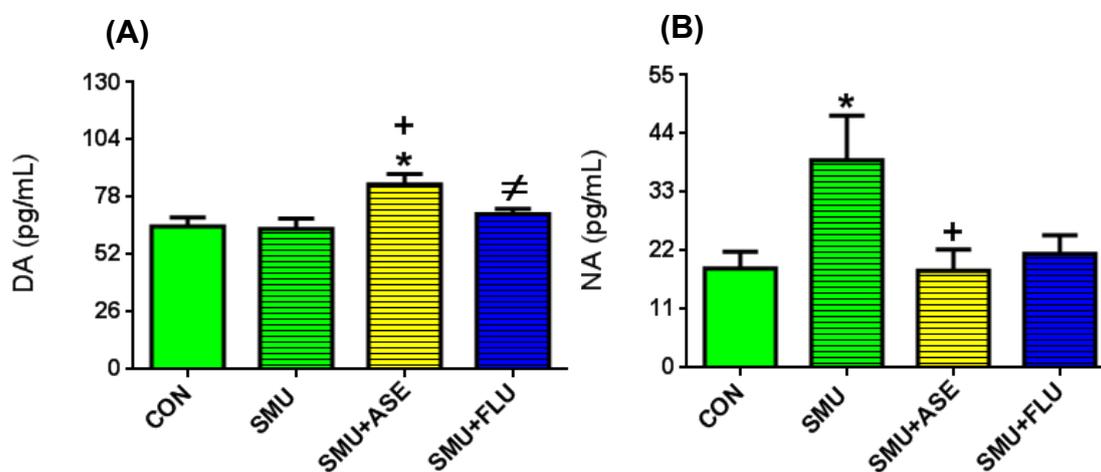
Fonte: O autor, 2018.

5.2.3 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas em ratos submetidos à separação materna única

Não houve diferença estatística nos níveis de DA em homogenato da glândula adrenal entre os grupos controle e SMU (Figura 20A). Todavia, o tratamento com ASE aumentou ($p < 0,05$) esses níveis no grupo SMU+ASE em comparação aos grupos CON, SMU e SMU+FLU (Figura 20A). Não houve diferença entre os grupos SMU+FLU, SMU e CON.

Por outro lado, foi observada diferença estatística nos níveis de NE em homogenato da glândula adrenal entre os grupos controle e SMU (Figura 20B). Outrossim, o tratamento com ASE reduziu ($p < 0,05$) esses níveis no grupo SMU+ASE em comparação aos grupos SMU (Figura 20B).

Figura 20 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de catecolaminas



Legenda: Níveis de DA (A) e de NE (B) em homogenato da glândula adrenal. Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna única (SMU), submetidos a separação materna única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação materna única tratados com fluoxetina (SMU + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON, + $p < 0,05$ em relação ao grupo SMU, conforme determinado pelo método one-way ANOVA; $\neq p < 0,05$ em relação ao grupo SMU+ASE, conforme determinado pelo método do teste-T de Student não-pareado.

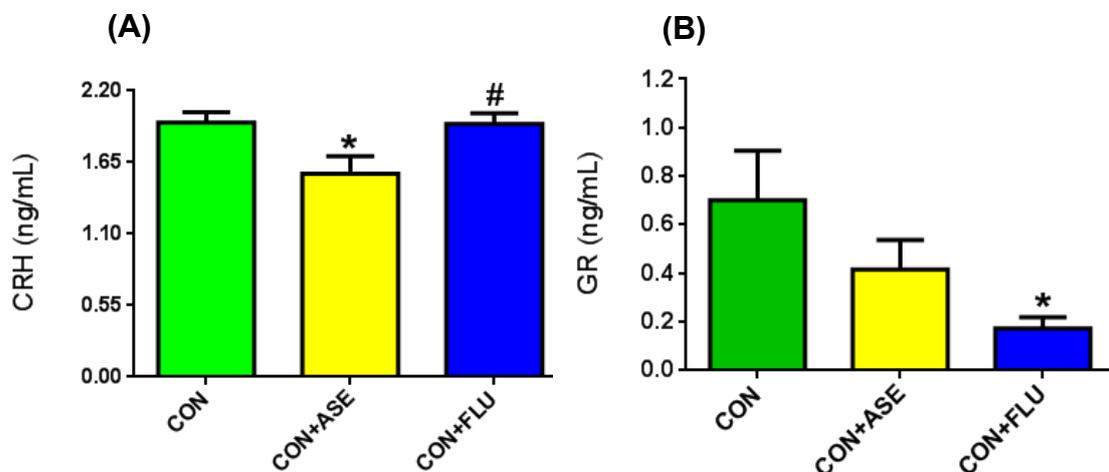
Fonte: O autor, 2018.

5.2.4 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos controles

Os níveis plasmáticos de CRH foram menores ($p < 0,05$) no grupo tratado com ASE (CON+ASE) em relação ao grupo controle (CON) e ao grupo tratado com fluoxetina (CON+FLU) (Figura 21A). Não houve diferença entre os grupos CON+FLU e CON (Figura 21A).

No tocante aos níveis plasmáticos do GR, foi observada ($P < 0,05$) entre o grupo tratado com fluoxetina (CON+FLU) e o grupo controle (CON) (Figura 21B). Não houve diferença entre os grupos CON+ASE e CON (Figura 21B).

Figura 21 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos controles



Legenda: Níveis plasmáticos de CRH (A) e do GR (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais controles tratados com ASE (CON+ASE), tratados com fluoxetina (CON + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON+ASE conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

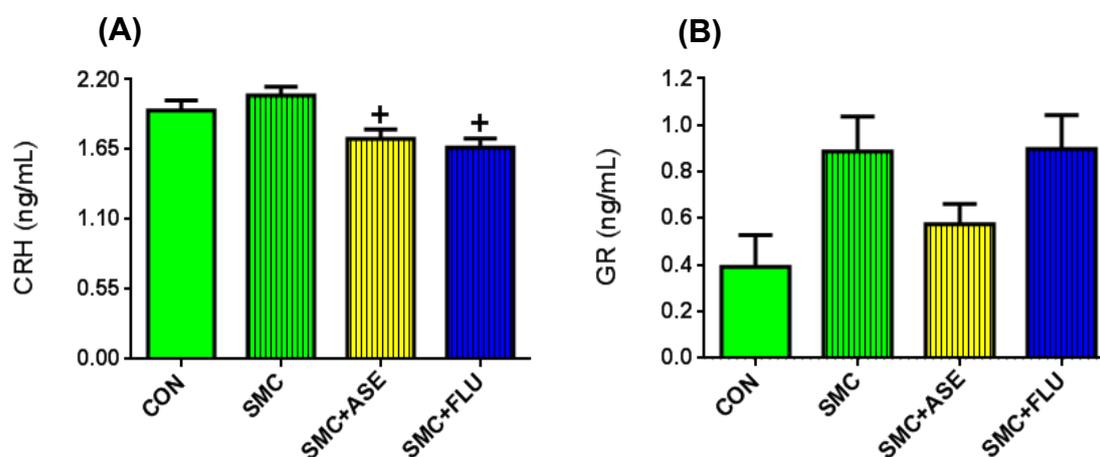
Fonte: O autor, 2018.

5.2.5 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR em ratos submetidos à separação materna crônica

Não houve diferença estatística nos níveis plasmáticos de CRH entre os grupos controle e SMC (Figura 22A). Contudo, o tratamento com ASE e com FLU aumentaram ($p < 0,05$) esses níveis nos grupos SMC+ASE e SMC+FLU em comparação ao grupo SMC (Figura 22A).

Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis plasmáticos do GR entre os diferentes grupos estudados (Figura 22B).

Figura 22 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR



Legenda: Níveis plasmáticos de CRH (A) e do GR (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna crônica (SMC), submetidos a separação materna crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação materna crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. $+p < 0,05$ em relação ao grupo SMC, conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

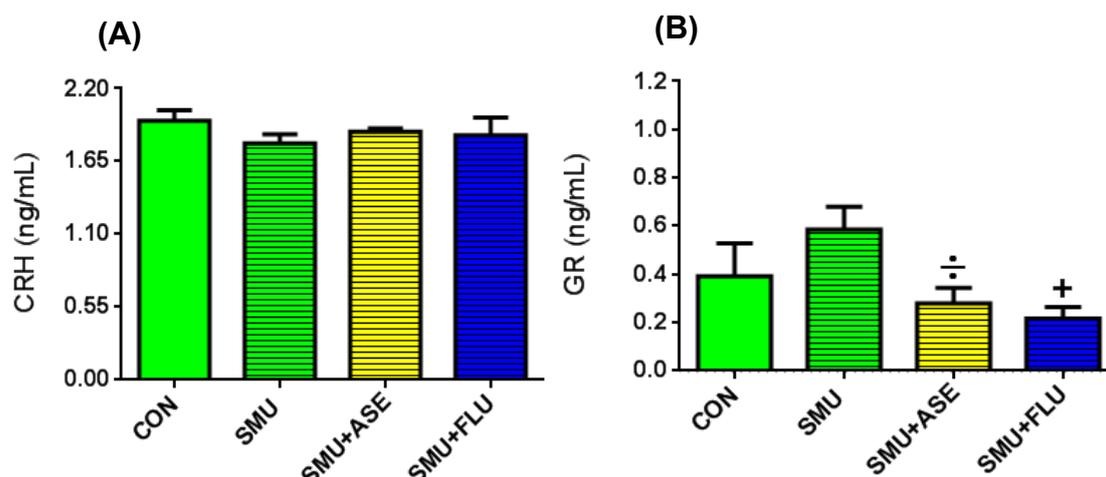
Fonte: O autor, 2018.

5.2.6 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis de CRH e GR em ratos submetidos à separação materna única

Não houve diferença estatística nos níveis plasmáticos de CRH entre os grupos estudados (Figura 23A).

Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis plasmáticos do GR entre os grupos SMU e controle (CON). Contudo, houve aumento dos níveis de GR nos grupos SMU+ASE e SMU+FLU ($P < 0,05$) em relação ao grupo SMU (Figura 23B).

Figura 23 – Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis plasmáticos de CRH e GR



Legenda: Níveis plasmáticos de CRH (A) e do GR (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna única (SMU), submetidos a separação materna única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação materna crônica tratados com fluoxetina (SMU + FLU).

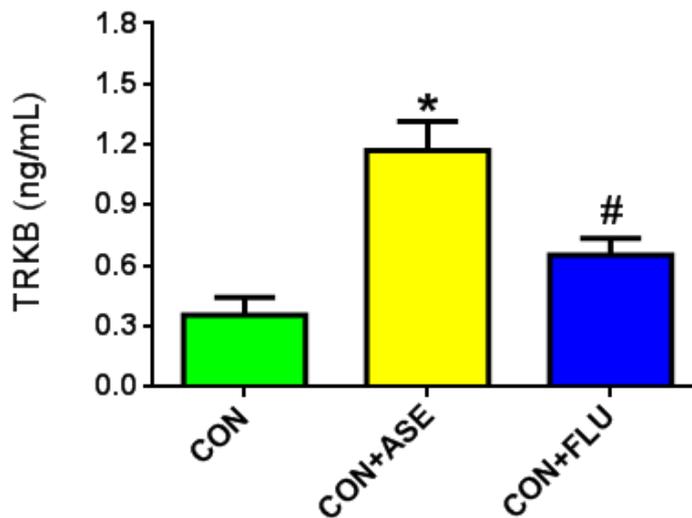
Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. $+p < 0,05$ em relação ao grupo SMU, conforme determinado pelo método one-way ANOVA, $\div p < 0,05$ em relação ao grupo SMU, conforme determinado pelo método do teste T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.2.7 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TrkB em ratos controles

Os níveis do receptor TrkB em homogenato do hipocampo foram maiores ($p < 0,05$) no grupo tratado com ASE (CON+ASE) em relação ao grupo controle (CON) e ao grupo tratado com fluoxetina (CON+FLU) (Figura 24). Não houve diferença entre os grupos CON+FLU e CON (Figura 24).

Figura 24: Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TRkB em ratos não separados



Legenda: Animais controles sem tratamento (CON), animais controles tratados com ASE (CON+ASE), tratados com fluoxetina (CON + FLU).

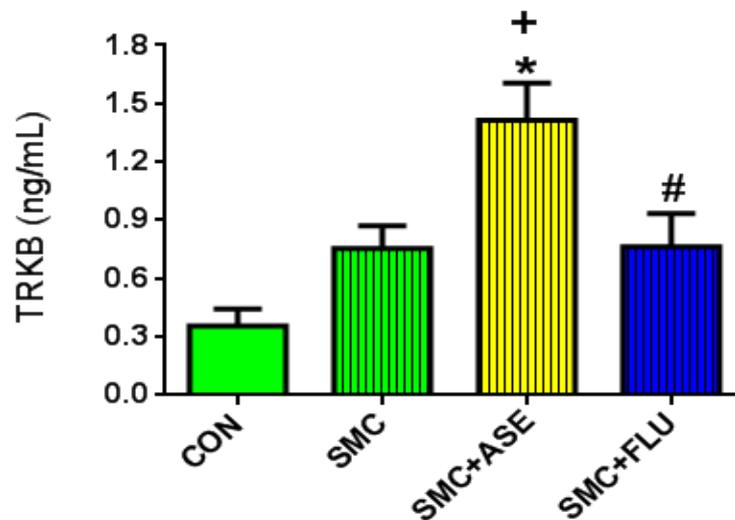
Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CON+ASE, conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

Fonte: O autor, 2018.

5.2.8 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TRkB em ratos submetidos à separação materna crônica

Não houve diferença estatística nos níveis do receptor TrkB em homogenato de hipocampo entre os grupos CON e SMC (Figura 25). Contudo, o tratamento com ASE aumentou ($p < 0,05$) esses níveis no grupo SMC+ASE em comparação aos grupos SMC e SMC+FLU (Figura 25). Não houve diferença entre os grupos SMC+FLU e SMC (Figura 25).

Figura 25: Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TRkB em ratos submetidos a SMC



Legenda: Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna crônica (SMC), submetidos a separação materna crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação materna crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

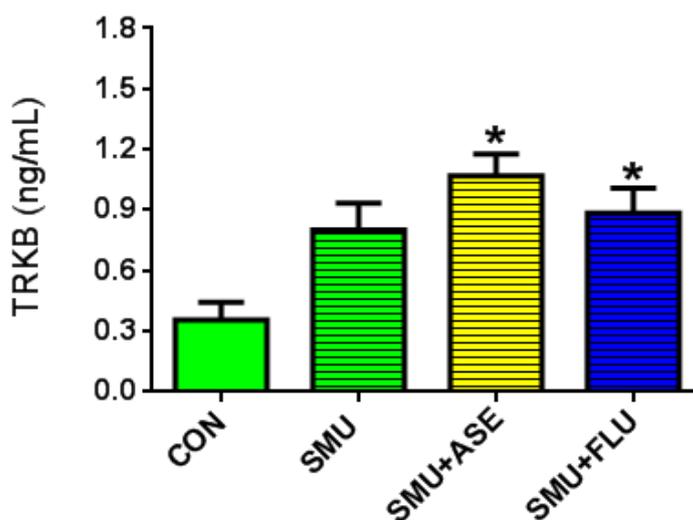
Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, + $p < 0,05$ em relação ao grupo SMC, e # $p < 0,05$ em relação ao grupo SMC+ASE, conforme determinado pelo método one-way ANOVA e pós teste turkey não-pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.2.9 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TRkB em ratos submetidos à separação materna única

Não houve diferença estatística nos níveis do receptor TrkB em homogenato de hipocampo entre os grupos controle (CON) e SMU (Figura 26). Contudo, o tratamento com ASE aumentou ($p < 0,05$) esses níveis no grupo SMU+ASE em comparação ao grupo CON e, de igual modo, esses níveis aumentaram no grupo SMU+FLU em comparação ao grupo CON (Figura 26).

Figura 26: Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre os níveis do receptor TRkB em ratos submetidos a SMU



Legenda: Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna única (SMU), submetidos a separação materna única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação materna única tratados com fluoxetina (SMU + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

Fonte: O autor, 2018.

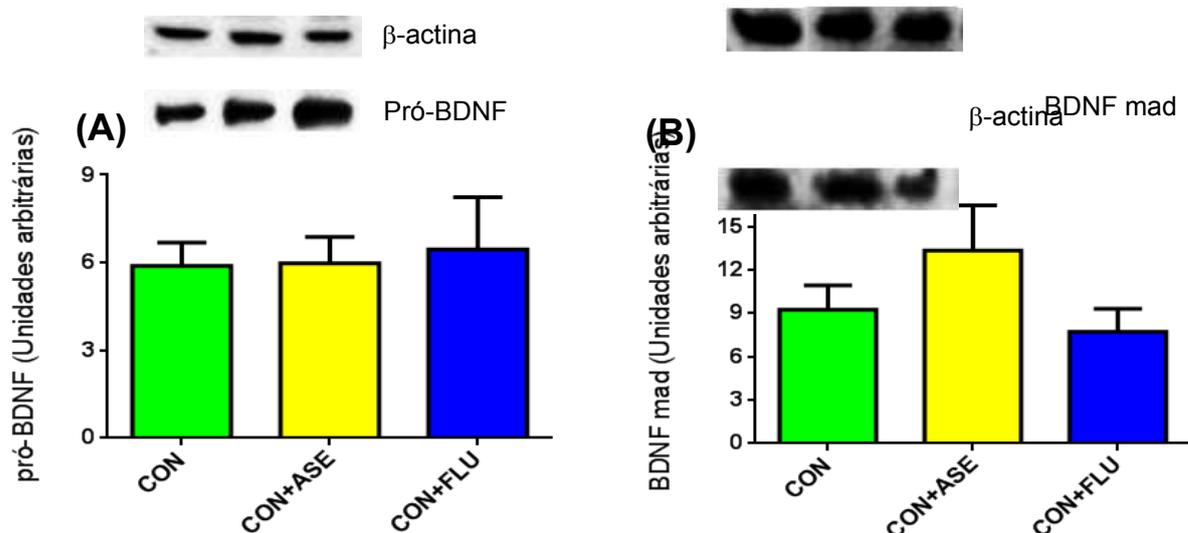
5.3 Determinação da expressão de proteínas por Western Blotting

5.3.1 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos controles

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos (Figura 27A).

Os grupos controle (CON), os tratados com ASE (CON+ASE) e com fluoxetina (CON+FLU) (Figura 27A e B) não demonstraram nenhuma diferença estatística entre si, no que tange à expressão do Pró-BDNF e do BDNF maduro em homogenato de hipocampo. Portanto, os tratamentos com ASE e com fluoxetina não foram capazes de modificar a expressão do BDNF maduro (Figura 27 B) e tampouco a do pró-BDNF (Figura 27 A).

Figura 27: Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos controles



Legenda: Expressão do pró-BDNF (A) e do BDNF-mad (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais controles tratados com ASE (CON+ASE), tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo.

Fonte: O autor, 2018.

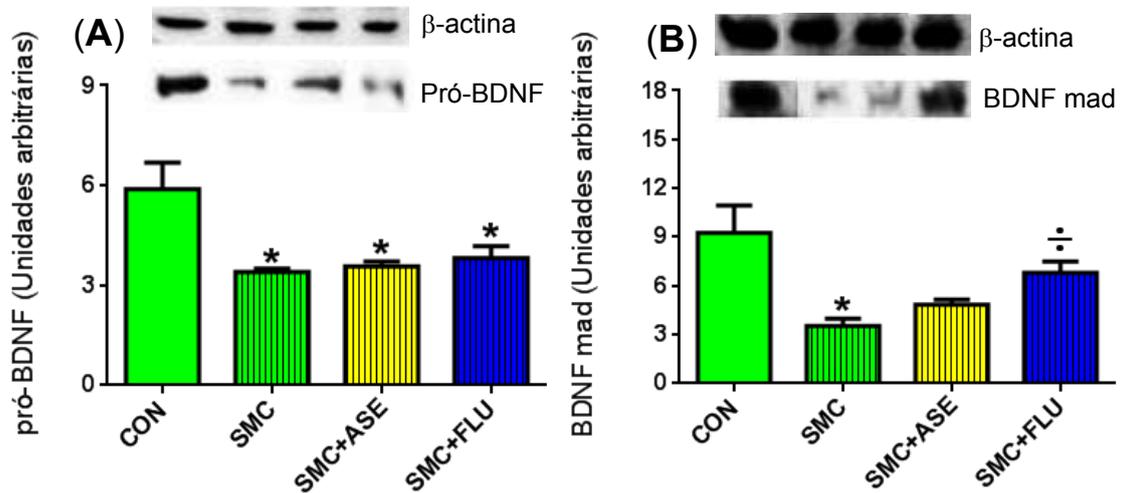
5.3.2 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a separação materna crônica

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos controles e os submetidos a SMC (Figura 28A).

Os grupos SMC, SMC+ASE e SMC+FLU demonstraram uma redução ($p < 0,05$) da expressão do Pró-BDNF em homogenato de hipocampo quando comparados ao grupo controle (Figura 28A). Os tratamentos com ASE e com FLU não foram capazes de modificar a expressão dessa proteína quando comparados ao grupo SMC (Figura 28A).

A expressão do BDNF maduro em homogenato de hipocampo foi menor ($p < 0,05$) no grupo SMC em relação ao grupo controle (Figura 28B). O tratamento com FLU aumentou ($p < 0,05$) a expressão desse fator neurotrófico no grupo SMC+FLU, em comparação ao grupo SMC (Figura 28B). Entretanto, o tratamento com ASE não modificou a expressão dessa proteína em comparação aos animais do grupo SMC (Figura 28B).

Figura 28 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a SMC



Legenda: Expressão do pró-BDNF (A) e do BDNF-mad (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, conforme determinado pelo método one-way ANOVA. [‡] $p < 0,05$ em relação ao grupo SMC, conforme determinado pelo test-T de Student não-pareado.

Fonte: O autor, 2018.

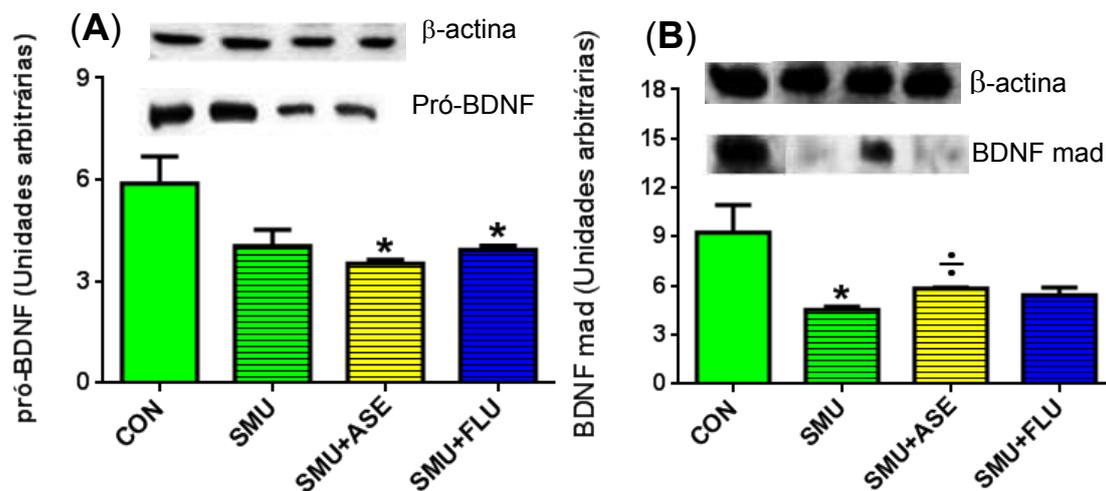
5.3.3 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a separação materna única

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos controles e os submetidos a SMU (Figura 29A).

Os grupos SMU+ASE e SMU+FLU demonstraram uma redução ($p < 0,05$) da expressão do Pró-BDNF em homogenato de hipocampo quando comparados ao grupo controle (Figura 29A). Os tratamentos com ASE e com FLU não foram capazes de modificar a expressão dessa proteína quando comparados ao grupo SMU (Figura 29A).

A expressão do BDNF maduro em homogenato de hipocampo foi menor ($p < 0,05$) no grupo SMU em relação ao grupo controle e ao grupo SMU-ASE (Figura 29B). O tratamento com FLU não foi capaz de modificar a expressão desse fator neurotrófico em comparação ao grupo SMU e controle (Figura 29B).

Figura 29 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão do BDNF em ratos submetidos a SMU



Legenda: Expressão do pró-BDNF (A) e do BDNF-mad (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação maternal crônica (SMU), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMU + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=4$ Wistar machos por grupo.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

[÷] $p < 0,05$ em relação ao grupo SMU, conforme determinado pelo test-T não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

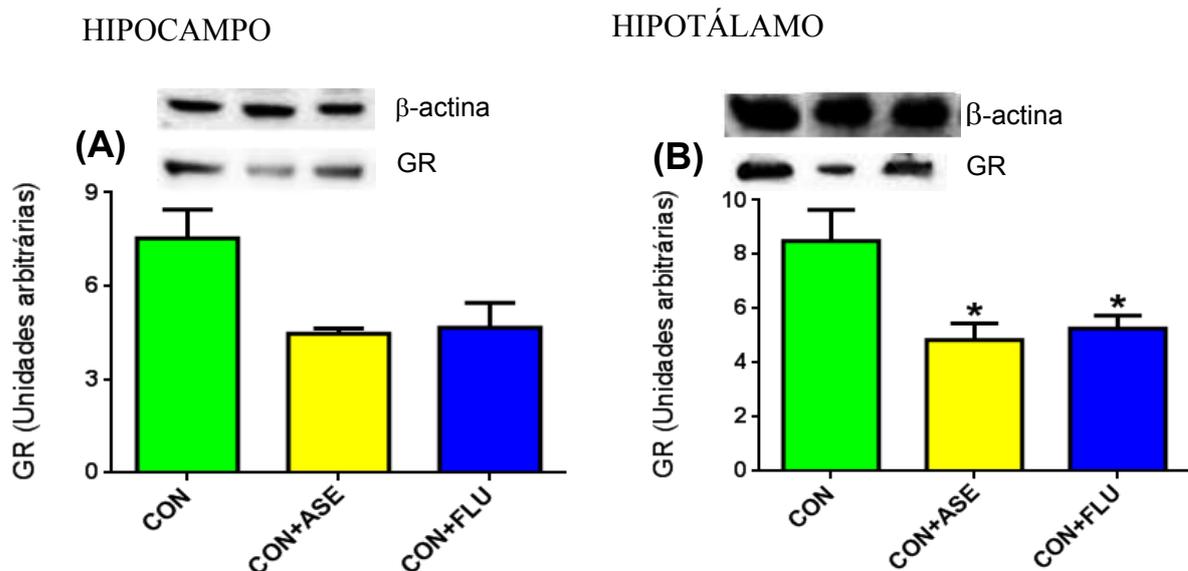
5.3.4 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos controles no hipocampo e no hipotálamo

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos controles e os tratados com ASE e fluoxetina (Figura 30A e 30B).

A expressão do GR em homogenato de hipocampo não demonstrou diferença estatística entre os grupos controle (CON), tratados com ASE (CON+ASE) e tratados com fluoxetina (CON+FLU) (Figura 30A).

No tocante à expressão do GR no hipotálamo, houve redução do GR nos grupos tratados com ASE e fluoxetina ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 30B). Assim sendo, os tratamentos com ASE e com FLU modificaram significativamente a expressão desse receptor em comparação aos animais do grupo controle (CON).

Figura 30 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos controles



Legenda: Receptor GR em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), tratados com ASE (CON+ASE), tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=4$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

Fonte: O autor, 2018.

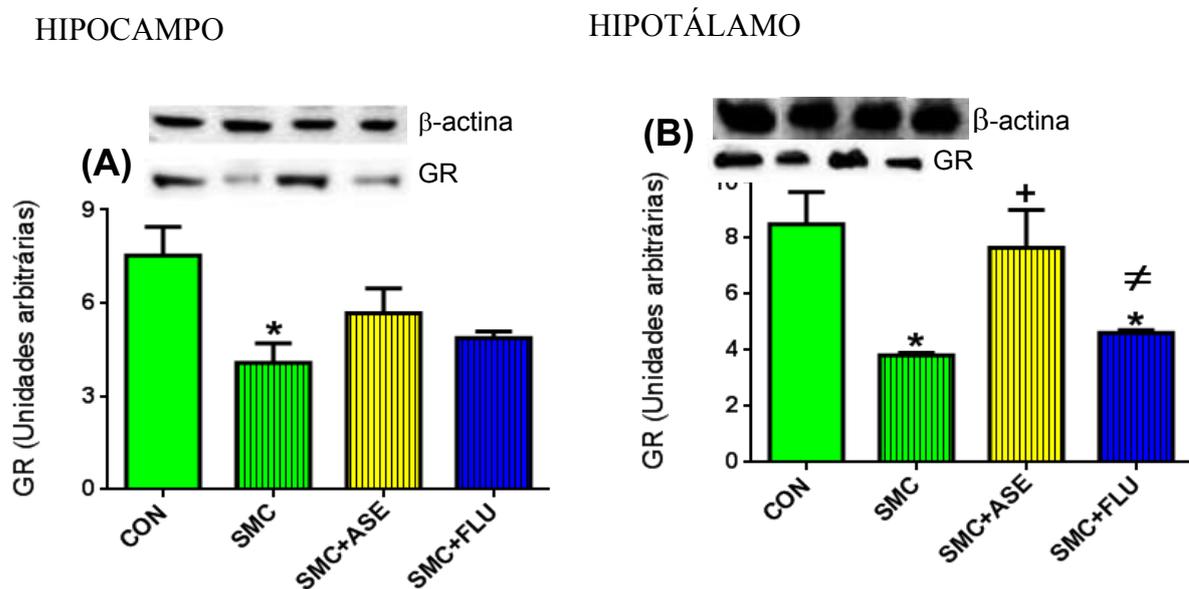
5.3.5 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos submetidos à separação materna crônica no hipocampo e hipotálamo

A proteína α -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos os grupos controles e os submetidos a SMC (Figura 31A e 31B).

A expressão do GR em homogenato de hipocampo foi menor ($p < 0,05$) no grupo SMC em relação ao grupo controle (Figura 31A). Os tratamentos com ASE e com FLU não modificaram significativamente a expressão desse receptor em comparação aos animais do grupo SMC (Figura 31A).

A expressão do GR em homogenato de hipotálamo foi menor ($p < 0,05$) nos grupos SMC e SMC+FLU em relação ao grupo controle (Figura 31B). O tratamento com ASE aumentou ($p < 0,05$) a expressão desse receptor no grupo SMC+ASE, em comparação ao grupo SMC (Figura 31B). Entretanto, o tratamento com FLU não modificou a expressão dessa proteína em comparação aos animais do grupo SMC (Figura 31B).

Figura 31: Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos submetidos à separação materna crônica



Legenda: Receptor GR em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna crônica (SMC), submetidos a separação materna crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação materna crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=4$ Wistar machos por grupo. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle; $+p<0,05$ em relação ao grupo SMC, conforme determinado pelo método one-way ANOVA. $\neq p<0,05$ em relação ao grupo SMC+ASE, conforme determinado pelo método do test-T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.3.6 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos submetidos à separação materna única no hipocampo e no hipotálamo

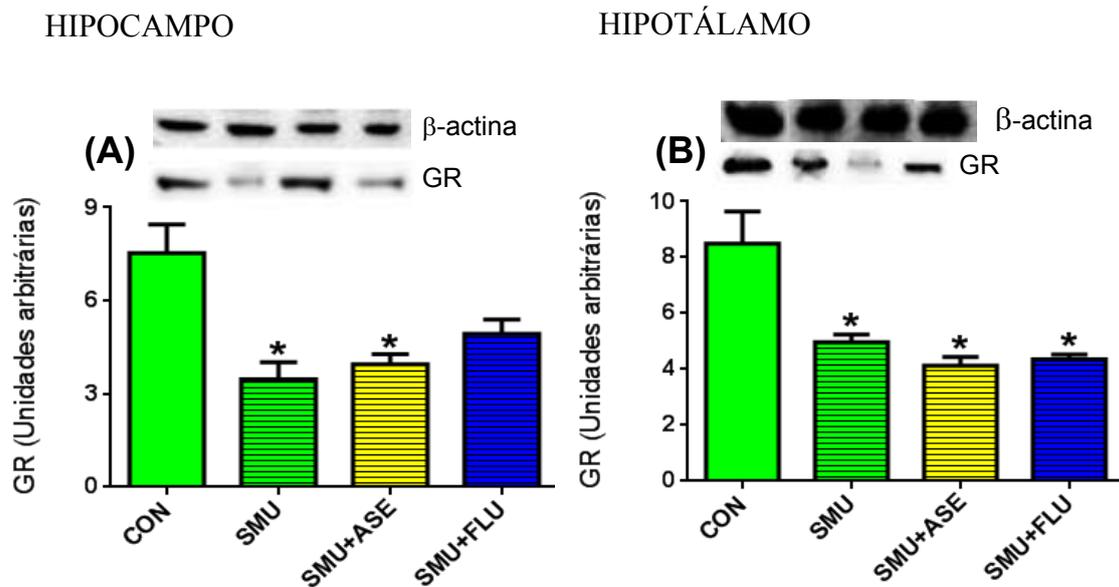
A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos os grupos controles e os submetidos a SMU (Figura 32A e 32B).

A expressão do GR em homogenato de hipocampo foi menor ($p<0,05$) no grupo SMU e SMU+ASE em relação ao grupo controle (Figura 32A). Os tratamentos com ASE e com fluoxetina não modificaram a expressão desse receptor em comparação aos animais do grupo SMU (Figura 32A).

A expressão do GR em homogenato de hipotálamo foi menor ($p<0,05$) nos grupos SMU, SMC+ASE e SMU+FLU em relação ao grupo controle (Figura 32B). Os

tratamentos com ASE e com fluoxetina não modificaram a expressão dessa proteína em comparação aos animais do grupo SMU (Figura 32B).

Figura 32 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de GR em ratos submetidos à separação materna única



Legenda: Receptor GR em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna única (SMU), submetidos a separação materna única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação materna única tratados com fluoxetina (SMU + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

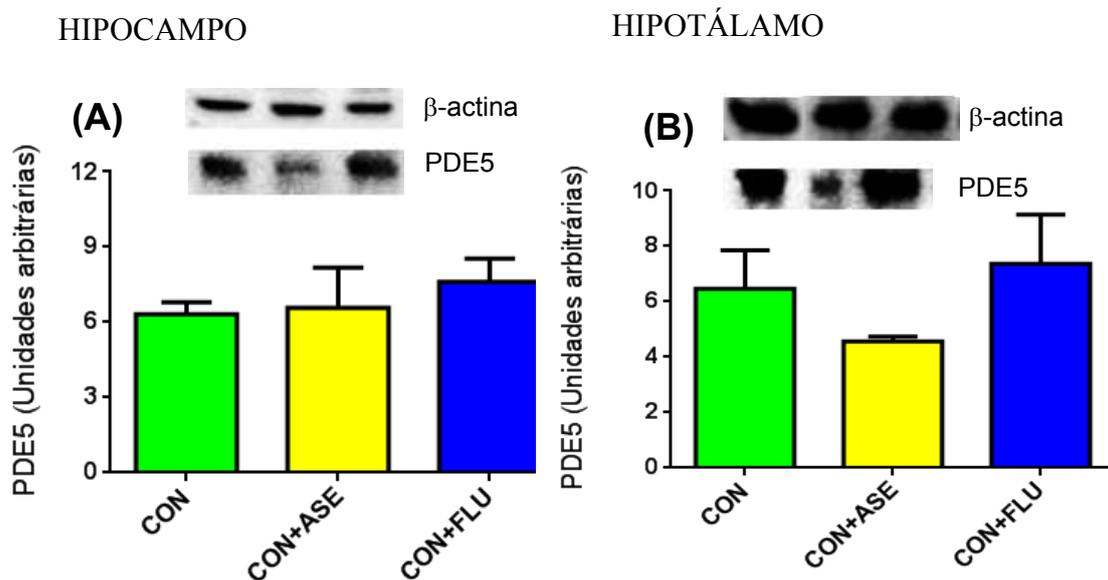
Fonte: O autor, 2018.

5.3.7 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos controles no hipocampo e no hipotálamo

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos controles e os tratados com ASE e fluoxetina (Figura 33A e B).

A expressão do PDE5 em homogenato, tanto do hipocampo como do hipotálamo (Figuras 33 A e B, respectivamente), não demonstrou diferença estatística entre os grupos controle (CON), tratados com ASE (CON+ASE) e tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Figura 33 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos controles



Legenda: Enzima PDE5 em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), tratados com ASE (CON+ASE), tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo. Resultados conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

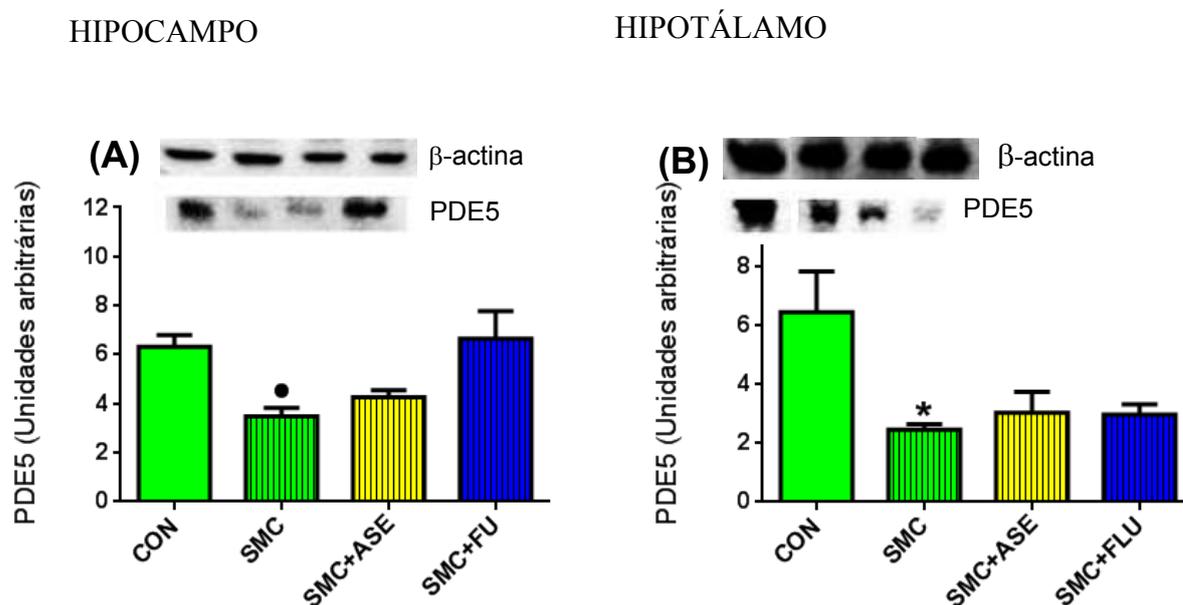
Fonte: O autor, 2018.

5.3.8 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos submetidos à separação materna crônica no hipocampo e hipotálamo

A proteína α -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos os grupos controles e os submetidos a SMC (Figura 34A e B).

A expressão da enzima PDE5 em homogenatos de hipocampo e hipotálamo foi maior ($P < 0,05$) no grupo SMC em relação ao grupo CON (Figura 34A e B). Os tratamentos com ASE e com FLU não modificaram a expressão dessa enzima em comparação aos animais do grupo SMC em ambos os tecidos (Figura 34A e B).

Figura 34 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos submetidos à separação materna crônica



Legenda: A enzima PDE5 em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna crônica (SMC), submetidos a separação materna crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação materna crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo.
 *p<0,05 em relação ao grupo controle conforme determinado pelo método one-way ANOVA,
 •p<0,05 em relação ao grupo CON conforme determinado pelo método do teste-T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

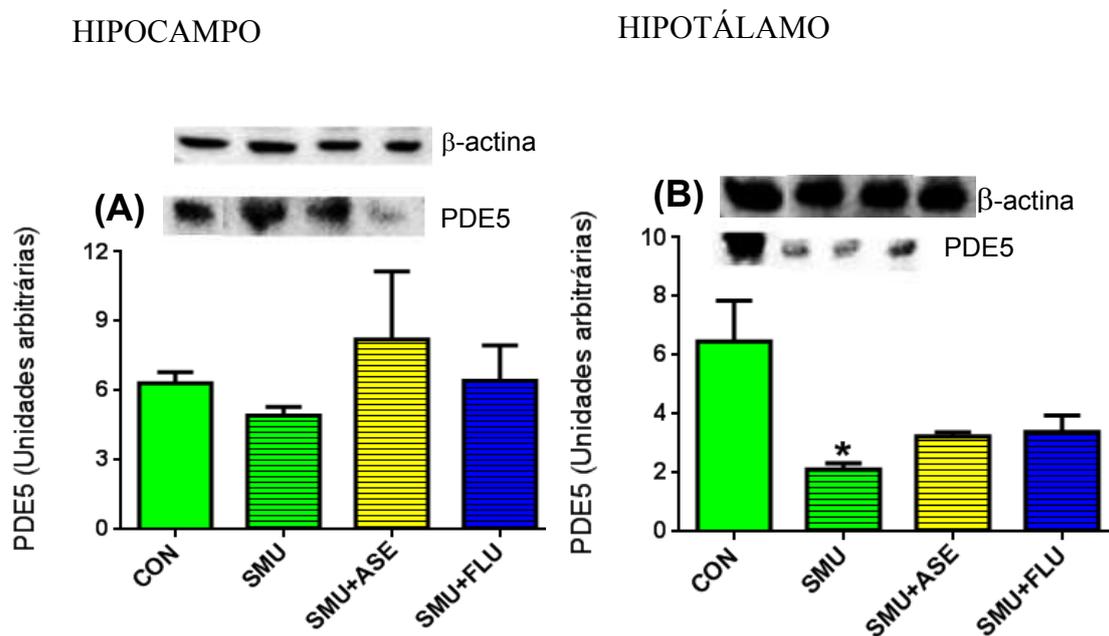
5.3.9 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos submetidos à separação materna única no hipocampo e hipotálamo

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos os grupos controles e os submetidos a SMU (Figura 35A e B).

A expressão da enzima PDE5 em homogenato de hipocampo não diferiu entre os grupos estudados (Figura 35A). Os tratamentos com ASE e com FLU não modificaram a expressão dessa enzima em comparação aos animais do grupo SMU (Figura 35A).

A expressão da enzima PDE5 em homogenato de hipotálamo foi menor ($p < 0,05$) no grupo SMU em relação ao grupo controle (Figura 35B). Os tratamentos com ASE e com fluoxetina não modificaram a expressão da PDE5 em comparação ao grupo SMC (Figura 35B).

Figura 35 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos submetidos à separação materna única



Legenda: A enzima PDE5 em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna única (SMU), submetidos a separação materna única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação materna única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=4$ Wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

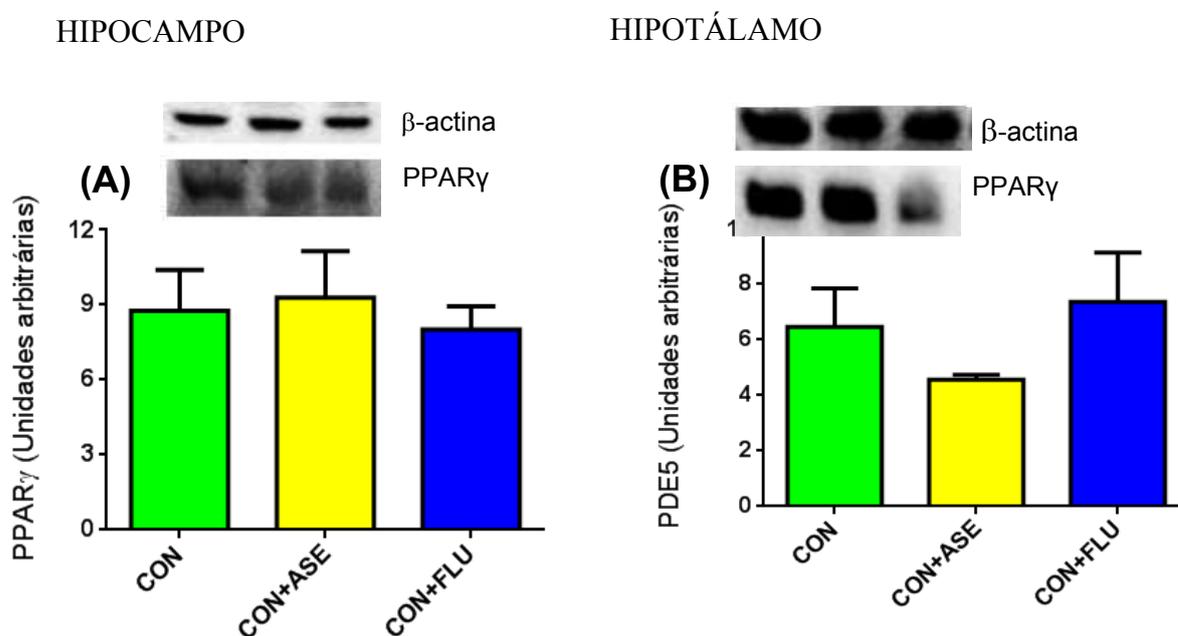
Fonte: O autor, 2018.

5.3.10 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPAR γ em ratos controles no hipocampo e no hipotálamo

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos controles e os tratados com ASE e fluoxetina (Figura 36A e B).

A expressão do PPAR γ em homogenato, tanto do hipocampo como do hipotálamo (Figuras 36 A e B, respectivamente), não demonstrou diferença estatística entre os grupos controle (CON), tratados com ASE (CON+ASE) e tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Figura 36 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPAR γ em ratos controles



Legenda: Enzima PPAR γ em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), tratados com ASE (CON+ASE), tratados com fluoxetina (CON+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo. Resultados conforme determinado pelo método one-way ANOVA.

Fonte: O autor, 2018.

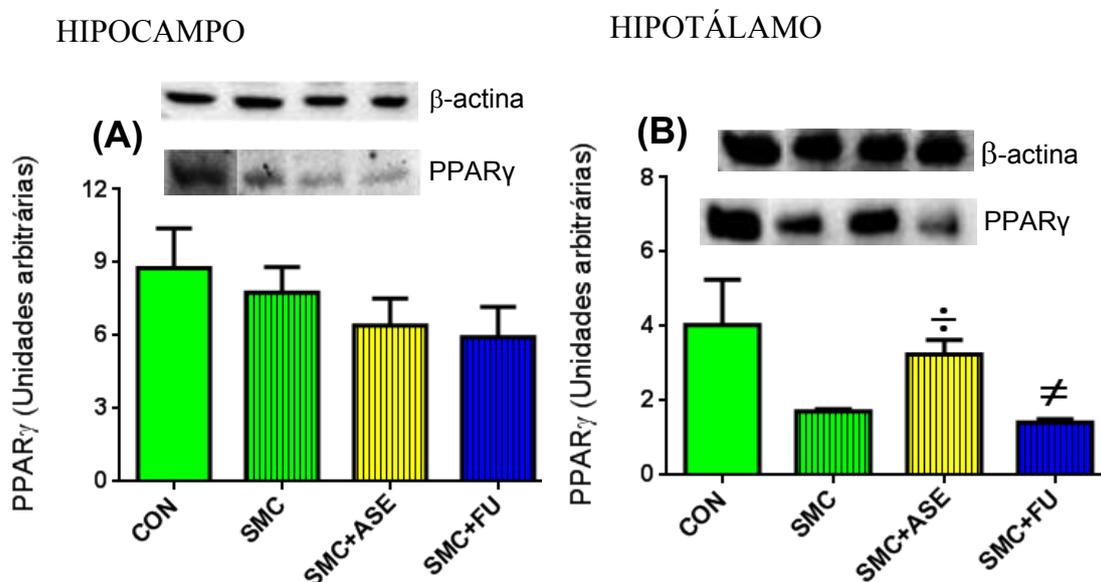
5.3.11 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPAR γ em ratos submetidos à separação materna crônica no hipocampo e hipotálamo

A proteína α -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos os grupos controles e os submetidos a SMC (Figura 37A e B).

A expressão do receptor PPAR γ em homogenato de hipocampo não diferiu entre os grupos estudados (Figura 37A). Os tratamentos com ASE e com FLU não modificaram a expressão desse receptor em comparação aos animais do grupo SMC (Figura 37A).

A expressão do receptor PPAR γ em homogenato de hipotálamo não demonstrou diferença estatística entre o grupo SMC e o grupo controle (Figura 37B). O tratamento com ASE aumentou a expressão de PPAR γ em relação ao grupo SMC e SMC+FLU (Figura 37B).

Figura 37 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPAR γ em ratos submetidos à separação materna crônica



Legenda: O receptor ppar γ em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna crônica (SMC), submetidos a separação materna crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação materna crônica tratados com fluoxetina (SMC + FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo. $\dagger p < 0,05$ em relação ao grupo SMC; $\neq p < 0,05$ em relação ao grupo SMC+ASE, conforme determinado pelo método do teste-T de Student não pareado.

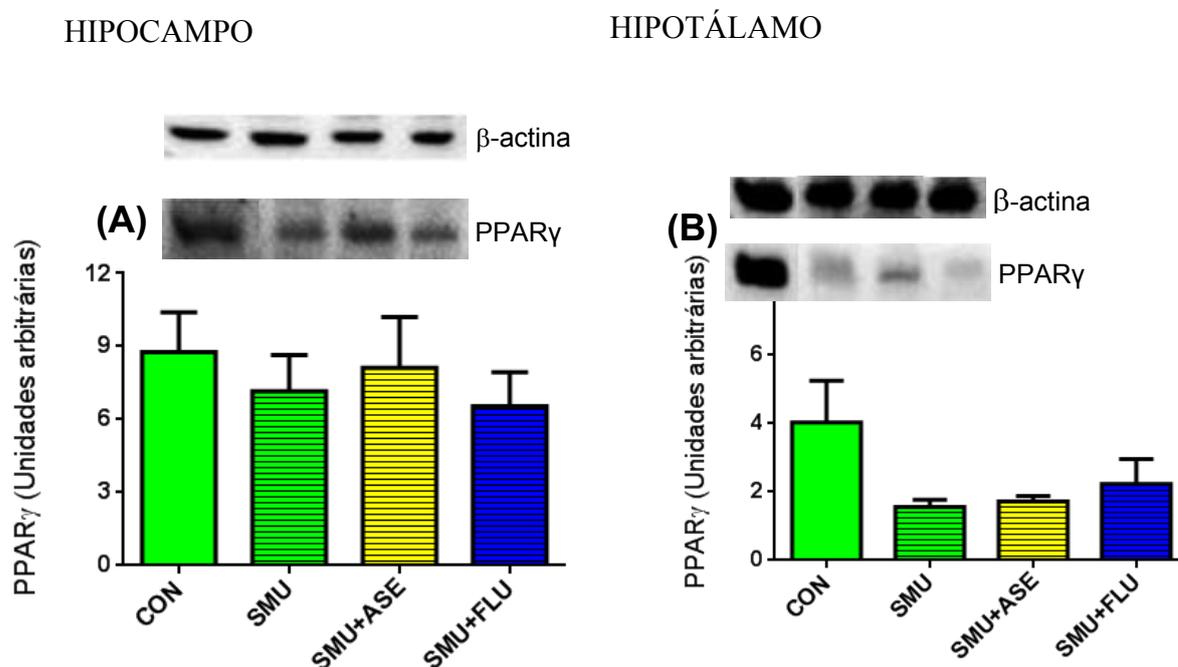
Fonte: O autor, 2018.

5.3.12 Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PPAR γ em ratos submetidos à separação materna única no hipocampo e hipotálamo

A proteína β -actina constitutiva foi utilizada como controle interno das amostras no hipocampo e no hipotálamo. Os níveis proteicos não diferiram entre os grupos os grupos controles e os submetidos a SMU (Figura 38A e B).

A expressão do receptor PPAR γ em homogenato, tanto do hipocampo como do hipotálamo, não diferiu entre os grupos estudados (Figura 38A e B). Os tratamentos com ASE e com FLU não modificaram a expressão desse receptor em comparação aos animais do grupo SMU (Figura 38A e B).

Figura 38 - Efeito do tratamento com ASE e com fluoxetina sobre a expressão de PDE5 em ratos submetidos à separação materna única



Legenda: O receptor PPAR γ em homogenato de hipocampo (A) e em homogenato de hipotálamo (B). Animais controles sem tratamento (CON), animais submetidos a separação materna única (SMU), submetidos a separação materna única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação materna única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=4 Wistar machos por grupo.

Fonte: O autor, 2018.

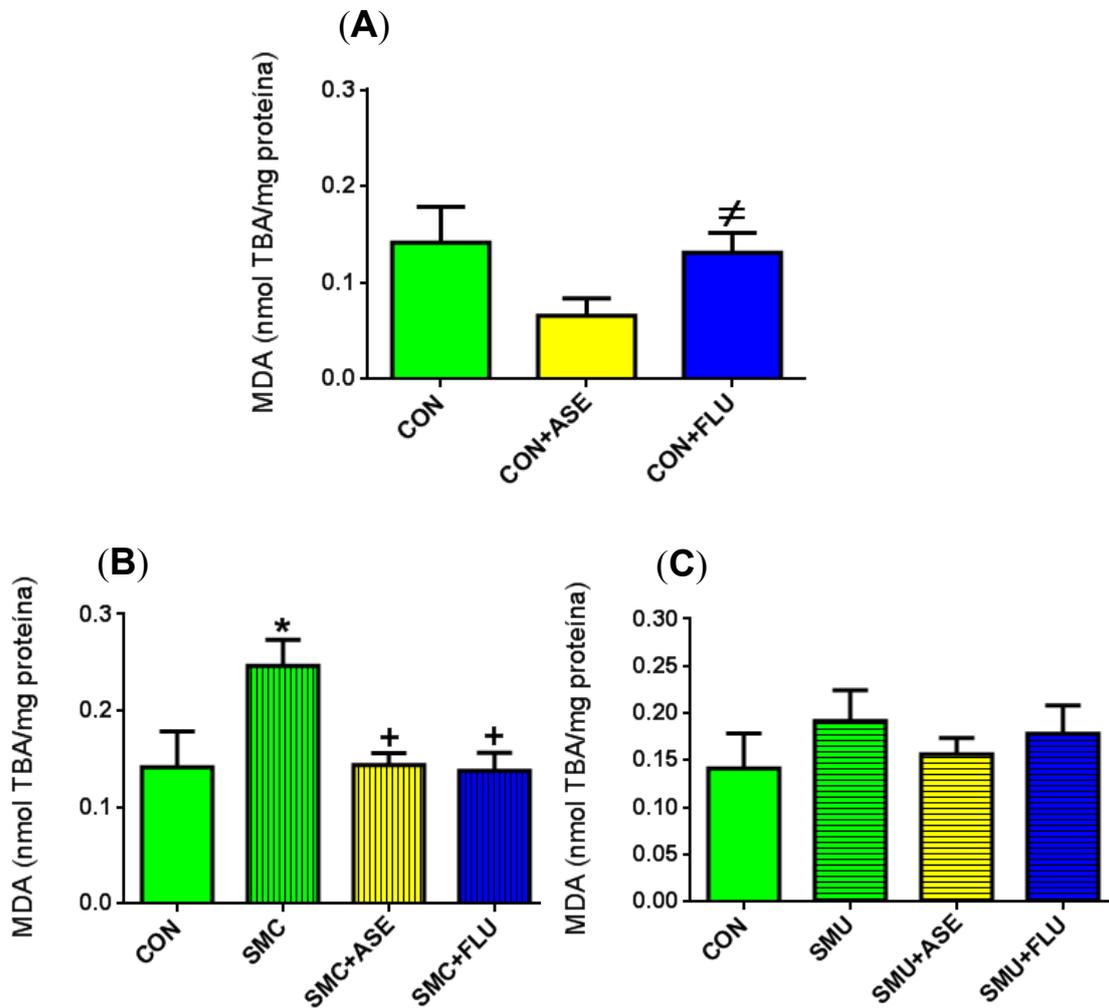
5.4 Ensaios pró-oxidantes, atividade enzimática antioxidante e medida de nitrito

5.4.1 Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de MDA

Os níveis de MDA presentes nas amostras de tronco encefálico dos animais controles tratados com ASE não diferiram daqueles do grupo controle (CON); entretanto, os níveis de MDA do grupo ASE foram menores em comparação aos do grupo fluoxetina (CON+FLU) (Figura 39A). Os níveis de MDA foram maiores ($P < 0,05$) no grupo de animais submetidos à SMC (SMC) quando comparados aos do grupo

controle (CON) (Figura 39B). Os animais submetidos à SMC tratados com ASE (SMC+ASE) e os tratados com fluoxetina (SMC+FLU) tiveram níveis de MDA significativamente reduzidos ($P < 0,05$) quando comparados aos do grupo SMC (Figura 39B). No que diz respeito aos animais submetidos à SMU, não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Figura 39C), portanto os animais SMU tratados com ASE e com fluoxetina não modificaram os níveis de MDA no grupo SMU.

Figura 39 - Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de MDA no tronco encefálico em ratos controles, submetidos a SMC e SMU.



Legenda: Níveis de MDA (nmol TBA/mg de proteína) em homogenato de tronco encefálico de (A) animais controles (CON, ASE, FLU); (B) animais submetidos a separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC+FLU); (C) animais submetidos a separação maternal única (SMU), submetidos a separação maternal única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

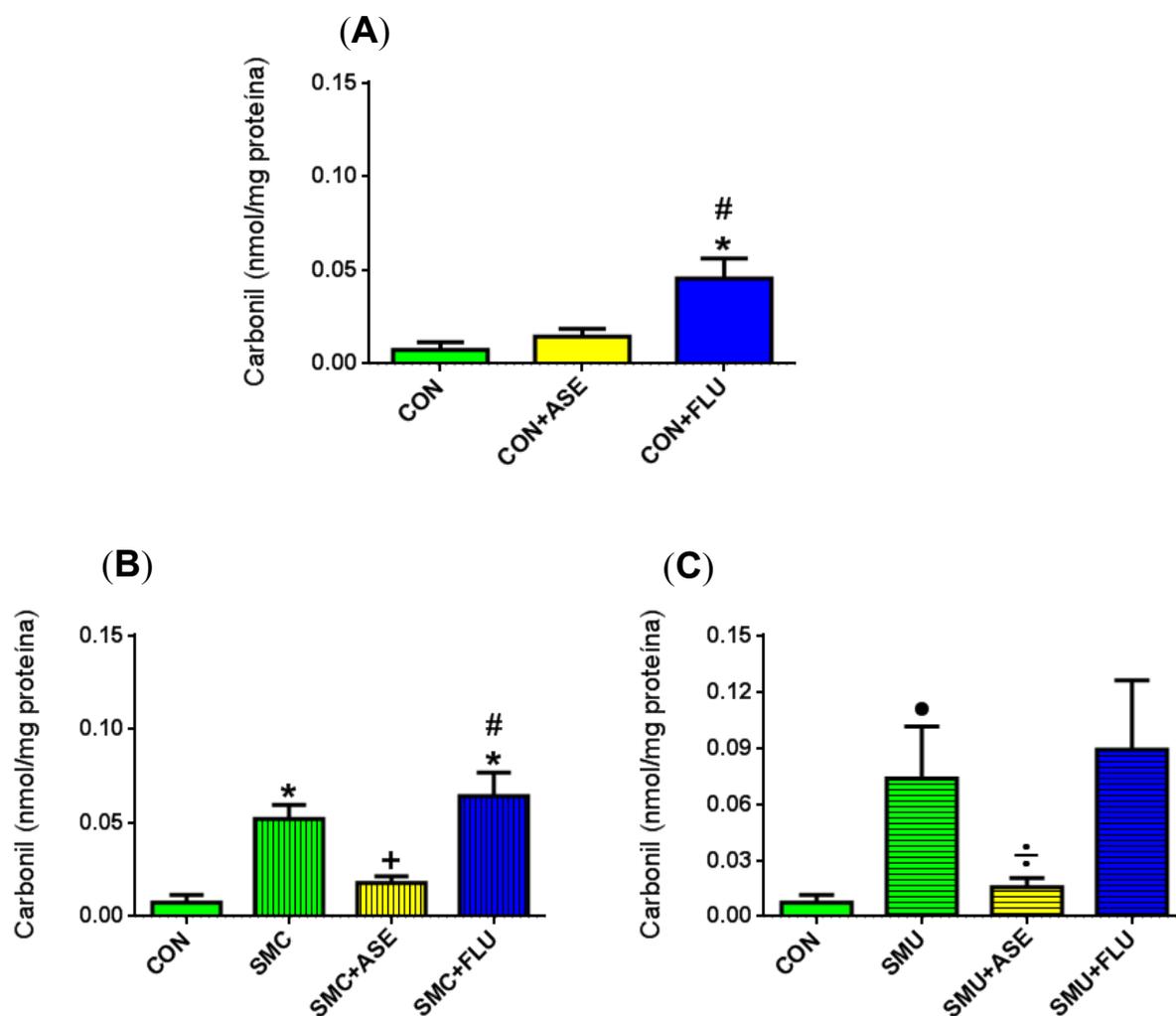
Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=6 Wistar machos por grupo. Para todos os grupos * $p < 0,05$ em relação ao grupo CON. + $p < 0,05$ em relação ao grupo SMC, conforme determinado pelo método one-way ANOVA; $\neq p < 0,05$ em relação ao grupo CON+ASE conforme determinado pelo teste T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.4.2 Efeito do tratamento com ASE sobre a carbonilação de proteínas

A carbonilação de proteínas em amostras de tronco encefálico foi maior ($p < 0,05$) em animais tratados com fluoxetina, comparados aos grupos controle (CON) e CON+ASE (Figura 40A). Não houve diferença entre os grupos CON+ASE e CON. A carbonilação de proteínas aumentou ($p < 0,05$) nos grupos SMC e SMU em relação ao grupo controle (CON) (Figuras 40B e C). O tratamento com ASE diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a carbonilação de proteínas nos animais dos grupos SMC+ASE e SMU+ASE, em comparação aos animais dos grupos SMC e SMU, respectivamente (Figuras 40B e C). Por outro lado, o tratamento com FLU não alterou a carbonilação de proteínas nos animais dos grupos SMC+FLU e SMU+FLU, em comparação aos animais dos grupos SMC e SMU, respectivamente (Figuras 40B e C).

Figura 40 - Efeito do tratamento com ASE sobre carbonilação de proteínas no tronco encefálico em ratos controles, submetidos a SMC e SMU



Legenda: Carbonilação de proteínas em homogenato do tronco encefálico de (A) animais controles (CON, ASE, FLU); (B) animais submetidos a separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC+FLU); (C) animais submetidos a separação maternal única (SMU), submetidos a separação maternal única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=6$ Wistar machos por grupo. Para todos os grupos $*p<0,05$ em relação ao grupo CON. $p<0,05$ em relação ao grupo SMC, $\#p<0,05$ em relação ao grupo SMC+ASE conforme determinado pelo método one-way ANOVA; $*p<0,05$ em relação ao grupo CON, $*p<0,05$ em relação ao grupo SMU conforme determinado pelo teste T de Student não pareado.

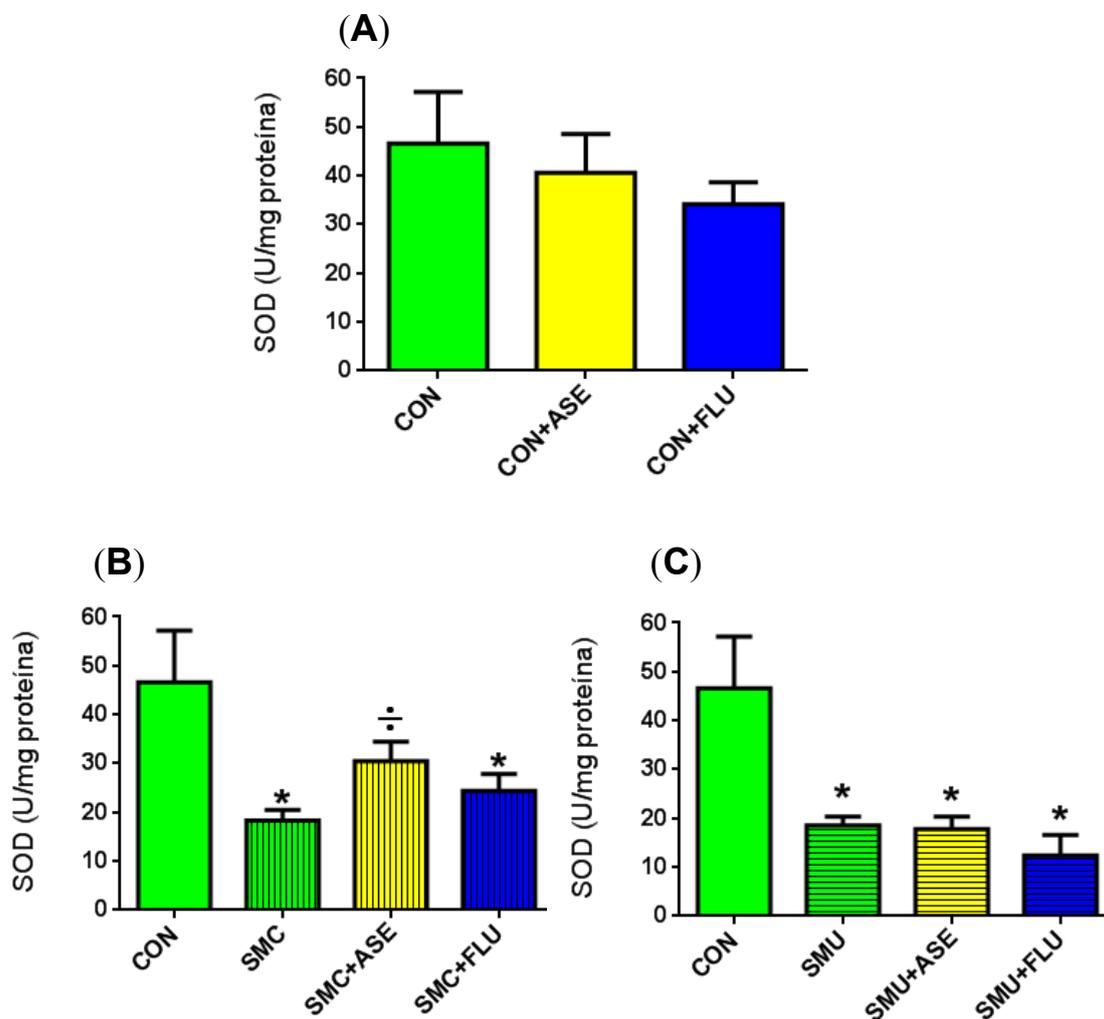
Fonte: O autor, 2018.

5.4.3 Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade das enzimas oxidantes

5.4.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD não diferiu entre o grupo controle (CON) e os tratados com ASE (CON+ASE) e fluoxetina (CON+FLU) (Figura 41A). No tocante aos animais submetidos à SMC, a atividade da enzima SOD foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida em homogenato do tronco encefálico dos animais dos grupos SMC e SMC+FLU quando comparada a de animais do grupo controle (CON) (Figura 41B). O tratamento com ASE nesses animais (SMC+ASE) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade desta enzima quando comparada a de animais do grupo SMC (Figura 41B). No que diz respeito aos animais submetidos à SMU, a atividade da enzima SOD foi significativamente ($p < 0,05$) menor em homogenato do tronco encefálico dos animais dos grupos SMU, SMU+ASE e SMU+FLU quando comparada a de animais do grupo controle (CON) (Figura 41C).

Figura 41 - Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade da enzima SOD no tronco encefálico em ratos controles, submetidos a SMC e SMU



Legenda: Atividade da enzima SOD em homogenato do tronco encefálico de (A) animais controles (CON, ASE, FLU); (B) animais submetidos à separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC+FLU); (C) animais submetidos a separação maternal única (SMU), submetidos à separação maternal única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

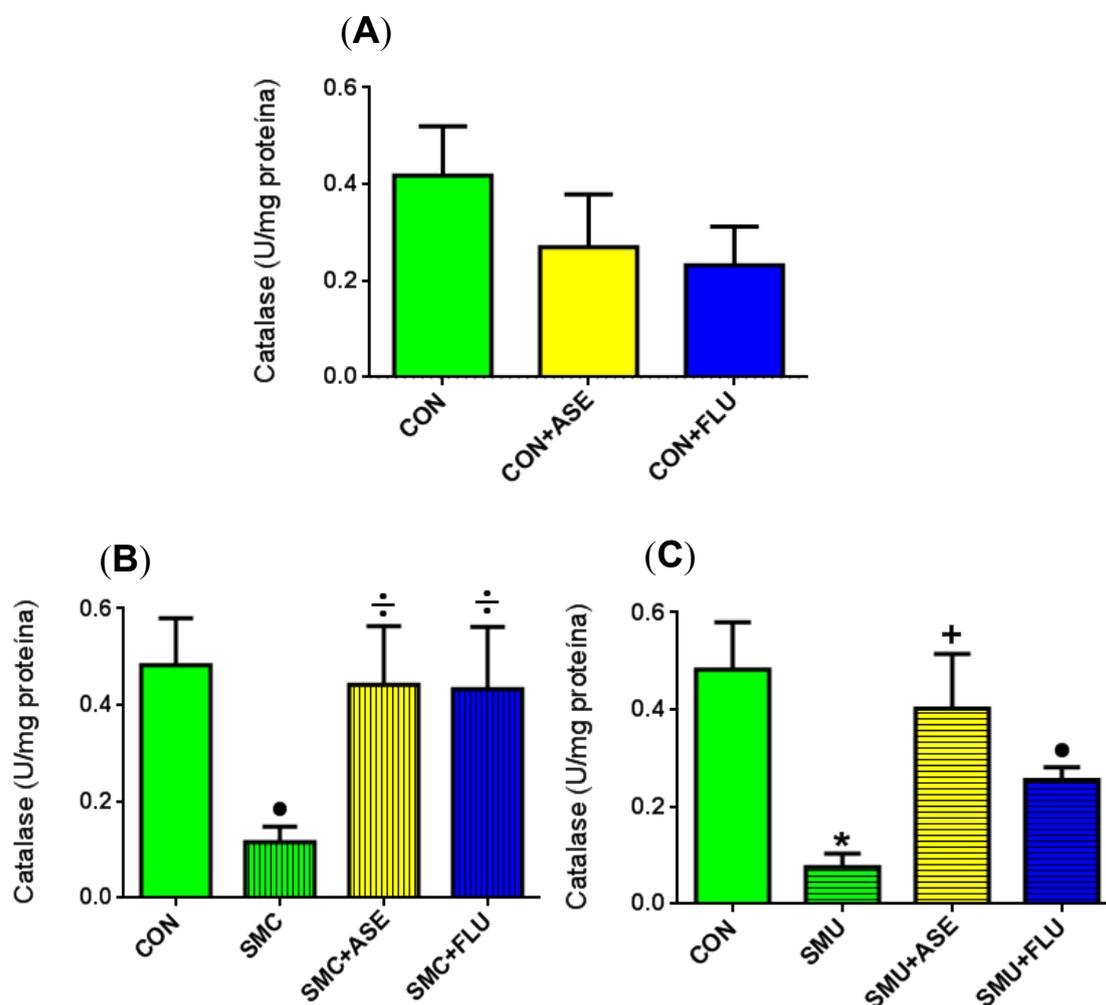
Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=6$ Wistar machos por grupo. Para todos os grupos $*p<0,05$ em relação ao grupo CON conforme determinado pelo método one-way ANOVA; $*p<0,05$ em relação ao grupo SMU conforme determinado pelo teste T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.4.3.2 Catalase

A atividade da enzima catalase em amostras de homogenato do tronco encefálico não diferiu entre o grupo controle (CON) e os tratados com ASE (CON+ASE) e fluoxetina (CON+FLU) (Figura 42A). No tocante aos animais submetidos à SMC, a atividade da enzima foi significativamente ($p < 0,05$) menor no grupo SMC quando comparada a do grupo controle (CON) (Figura 42B). Houve aumento significativo ($p < 0,05$) das atividades da catalase nos grupos tratados com ASE (SMC+ASE) e com fluoxetina (SMC+FLU) em relação ao grupo SMC (Figura 42B). No que diz respeito aos animais submetidos à SMU, a atividade da catalase foi significativamente ($p < 0,05$) menor nos grupos SMU e SMU+FLU quando comparada a do grupo controle (CON) (Figura 42C). Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade da enzima no grupo SMU+ASE em comparação ao grupo SMU (Figura 42C).

Figura 42 - Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade da enzima catalase no tronco encefálico em ratos controles, submetidos a SMC e SMU



Legenda: Atividade da enzima catalase em homogenato do tronco encefálico de (A) animais controles (CON, ASE, FLU); (B) animais submetidos à separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC+FLU); (C) animais submetidos a separação maternal única (SMU), submetidos à separação maternal única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

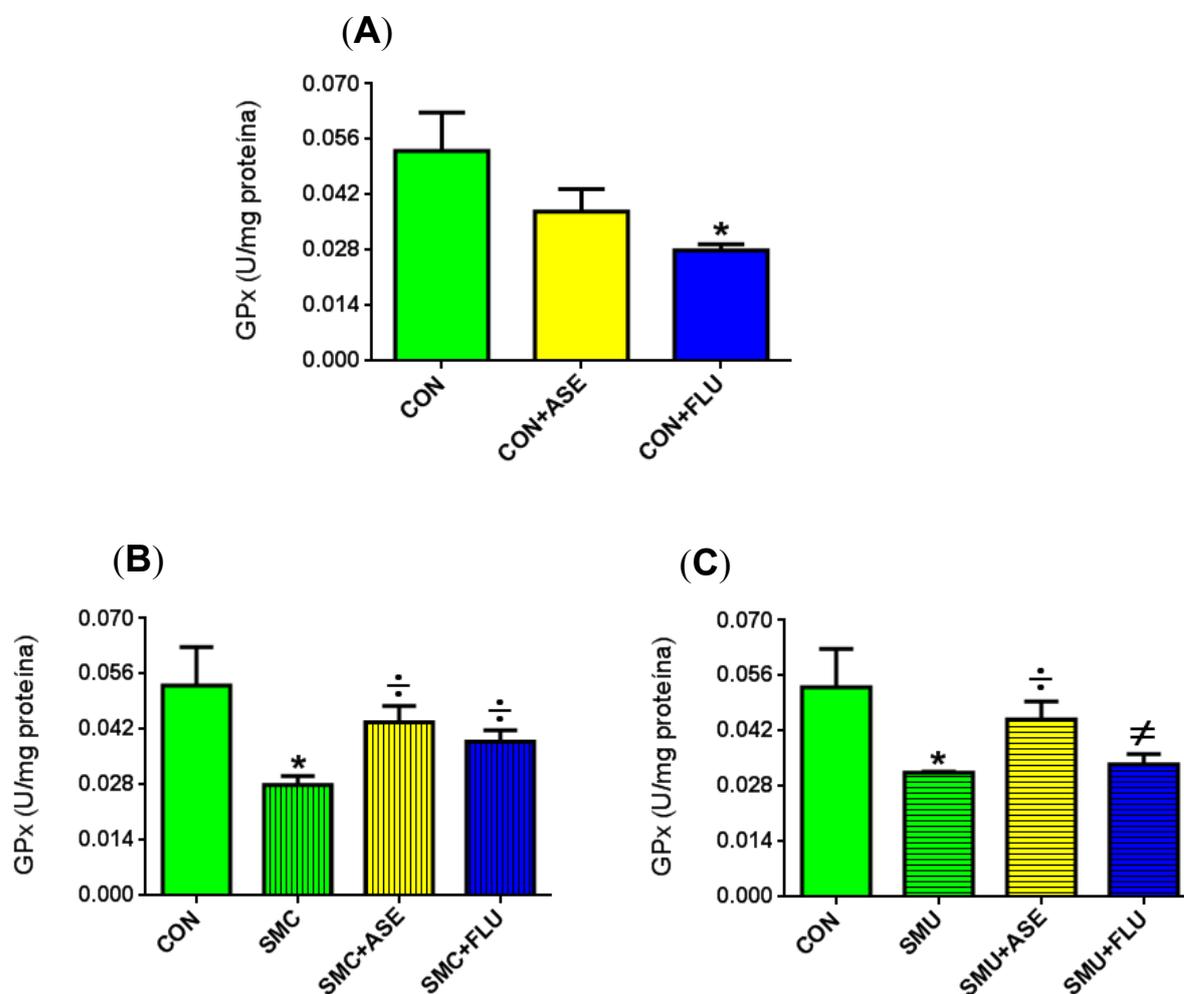
Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=6$ Wistar machos por grupo. Para todos os grupos $*p<0,05$ em relação ao grupo CON, $+p<0,05$ em relação ao grupo SMU conforme determinado pelo método one-way ANOVA;
 $\bullet p<0,05$ em relação ao grupo CON, $*p<0,05$ em relação ao grupo SMC conforme determinado pelo teste T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.4.3.4 Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida em homogenato do tronco encefálico dos animais tratados com fluoxetina (CON+FLU) quando comparada à de animais do grupo controle (CON) (Figura 43A). Com referência aos animais submetidos à SMC, a atividade da enzima GPx foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo SMC comparada à do grupo controle (CON) (Figura 43B). O tratamento com ASE nos animais submetidos à SMC (SMC+ASE) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima GPx comparativamente aos animais dos grupos SMC e SMC+FLU (Figura 43B). Com relação aos animais submetidos à SMU, a atividade da enzima GPx foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo SMU comparada à do grupo controle (CON) (Figura 43C). Os tratamentos com ASE e com fluoxetina, nos respectivos grupos SMU+ASE e SMU+FLU, aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima GPx em comparação aos animais do grupo SMU (Figura 43C).

Figura 43 - Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade da enzima GPx no tronco encefálico em ratos controles, submetidos a SMC e SMU



Legenda: Atividade da enzima GPx em homogenato do tronco encefálico de (A) animais controles (CON, ASE, FLU); (B) animais submetidos à separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC+FLU); (C) animais submetidos a separação maternal única (SMU), submetidos à separação maternal única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

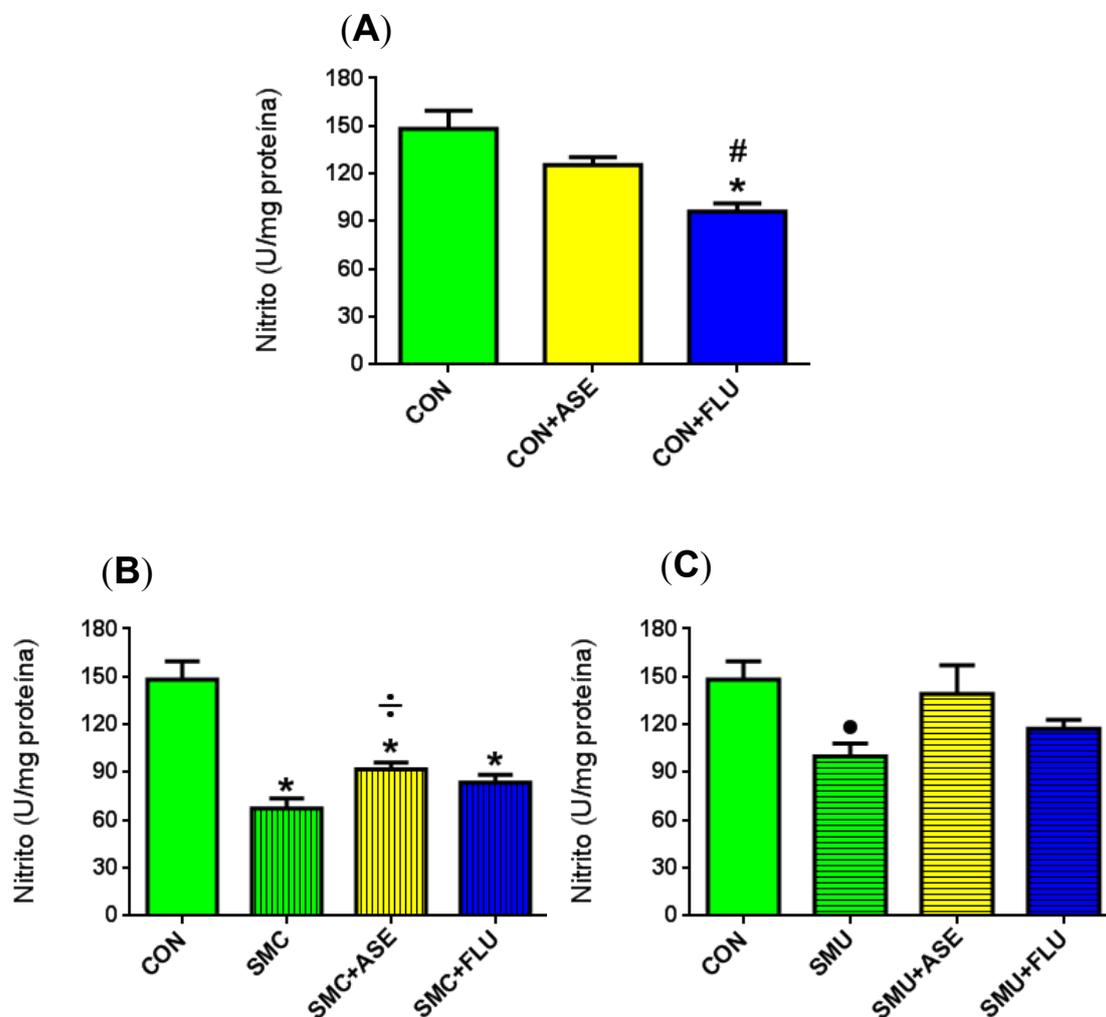
Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. Para todos os grupos $*p<0,05$ em relação ao grupo CON conforme determinado pelo método one-way ANOV; $^{\dagger}p<0,05$ em relação ao grupo CON, $^{\ddagger}p<0,05$ em relação ao grupo SMC ou SMU conforme determinado pelo teste T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

5.4.4 Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de nitrito

Os níveis de nitrito foram significativamente ($p < 0,05$) reduzidos em homogenato do tronco encefálico dos animais tratados com fluoxetina (CON+FLU) quando comparados aos dos animais dos grupos controle (CON) e CON+ASE (Figura 44A). Entretanto, o tratamento com ASE (CON+ASE) não modificou os níveis de nitrito comparados aos do grupo CON. No tocante aos animais submetidos à SMC, os níveis de nitrito foram significativamente ($p < 0,05$) menores nos grupos SMC, SMC+ASE e SMC+FLU quando comparados aos do grupo controle (CON) (Figura 44B). O tratamento com ASE (SMC+ASE) aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de nitrito quando comparados aos do grupo SMC (Figura 44B). Com relação aos animais submetidos à separação materna única, os níveis de nitrito foram significativamente ($p < 0,05$) menores no grupo SMU quando comparados aos do grupo controle (CON) (Figura 44C). No entanto, os tratamentos com ASE e fluoxetina não modificaram os níveis de nitrito nos respectivos grupos SMU+ASE e SMU+FLU quando comparados aos níveis dos grupos CON e SMU (Figura 44C).

Figura 44 - Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de nitrito no tronco encefálico em ratos controles, submetidos a SMC e SMU



Legenda: Níveis de nitrito em homogenato do tronco encefálico de (A) animais controles (CON, ASE, FLU); (B) animais submetidos à separação maternal crônica (SMC), submetidos a separação maternal crônica tratados com ASE (SMC+ASE), submetidos a separação maternal crônica tratados com fluoxetina (SMC+FLU); (C) animais submetidos a separação maternal única (SMU), submetidos à separação maternal única tratados com ASE (SMU+ASE), submetidos a separação maternal única tratados com fluoxetina (SMU+FLU).

Notas: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ Wistar machos por grupo. Para todos os grupos $*p<0,05$ em relação ao grupo CON, $\#p<0,05$ em relação ao grupo CON+ASE conforme determinado pelo método one-way ANOVA; $\bullet p<0,05$ em relação ao grupo CON, $\dagger p<0,05$ em relação ao grupo SMC conforme determinado pelo teste T de Student não pareado.

Fonte: O autor, 2018.

6 DISCUSSÃO

A depressão é a principal causa de incapacidade no mundo e o principal contribuinte para as mortes por suicídio (OMS, 2017), sendo apontada também como participante efetiva e importante no aumento do índice de doenças físicas (PAYKEL, 2006). Apesar do avanço no tratamento farmacológico da depressão, muitos dos antidepressivos disponíveis apresentam baixas respostas, além de ocasionar severos efeitos colaterais (SARKO, 2000; CORRELL; SCHRIDAN; DELBELLO, 2010; IJAZ *et al.*, 2018). Com efeito, sabe-se que uma parcela considerável dos pacientes deprimidos, aproximadamente um terço, não responde aos antidepressivos, e um terço dos pacientes tratados, na verdade, responde ao placebo (BELMAKER, 2008). Neste contexto, faz-se necessário buscar novos agentes antidepressivos, como alternativas farmacológicas, que possam atuar com menos efeitos colaterais, de forma mais seletiva, eficaz e mais rápida, podendo levar a uma maior adesão dos pacientes.

Na prática, a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo aceito pelos pacientes e, em geral, vem ocupando espaço junto à classe médica (BALUNAS; KINGHORN, 2005; FAJEMIROYE *et al.*, 2016). De fato, muitos trabalhos vêm demonstrando os potenciais efeitos bioativos e farmacológicos de plantas medicinais, em particular plantas provenientes da Amazônia brasileira, uma vez que possui uma grande biodiversidade regional (SAKAKIBARA *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2006, 2011; VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014; MACHADO *et al.*, 2015). Nessa perspectiva, uma planta amazônica que está se destacando é a *Euterpe oleracea* Mart., o açaizeiro (MUÑIZ-MIRET *et al.*, 1996; KANG *et al.*, 2012), cujo fruto possui diversas moléculas bioativas que facultam a este fruto potenciais atividades farmacológicas (MATHEUS *et al.*, 2007; POULOUSE *et al.*, 2012). Neste sentido, estudos pioneiros realizados pelo nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcolólico do caroço do açaí (ASE) é rico em polifenóis com propriedades benéficas sobre o sistema cardiovascular e metabolismo lipídico e glicídico (ROCHA *et al.*, 2007; 2008; DA COSTA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2010; 2015; CORDEIRO *et al.*, 2017). Com base nessas propriedades e sua ação antinociceptiva em modelos experimentais de dor neuropática (SUDO *et al.*, 2015), acreditamos que o extrato pode ter alguma atuação no Sistema Nervoso Central, interferindo de forma indireta ou

direta na ação de neuropeptídios, como o CRH e a NE, e possivelmente apresentando alguma atividade antidepressiva.

Portanto, no presente estudo avaliamos o efeito antidepressivo do ASE, procurando identificar se esse extrato exerce efeito sobre neurotransmissores, neuropeptídios e proteínas considerados como alvos importantes na fisiopatologia da depressão. Além disso, avaliamos um possível efeito antioxidante central. Todos os experimentos foram realizados comparando o ASE com um dos antidepressivos mais utilizados atualmente, a fluoxetina (inibidor seletivo da recaptção de serotonina) em animais submetidos ou não à separação materna, no teste do nado forçado (teste de Porsolt).

O teste de nado forçado apresenta uma validade preditiva aceitável, sendo largamente utilizado para investigar a atividade farmacológica de antidepressivos (MCGONIGLE, 2014). Este teste tem sido extensivamente utilizado para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos e para o entendimento dos mecanismos neuronais responsáveis pelo comportamento depressivo (WILLNER, 1985; WILLNER; MITCHELL, 2002; NUNES; HALLAK, 2014), que refletem o desamparo aprendido descrito inicialmente por PORSOLT *et al.* (1977). A sensibilidade do referido teste a um vasto conjunto de antidepressivos é a característica capital que fundamenta seu uso como modelo de rastreio de drogas capazes de serem utilizadas como agentes antidepressivos. Vale salientar que as classes de fármacos clinicamente usadas no tratamento da depressão e que são identificadas pelo teste de Porsolt compreendem os antidepressivos tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase (IMAOs) e derradeiramente os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) (McGONIGLE, 2014), aos quais pertence a fluoxetina.

Apesar disso, existem limitações a este modelo, sendo uma das mais importantes a de que o estado de desamparo aprendido não é sustentado e, além disso, responde agudamente ao uso de antidepressivos, ao contrário do que se observa em pacientes deprimidos, que geralmente melhoram após algumas semanas do uso da medicação (ABELAIRA *et al.*, 2013; NUNES; HALLAK, 2014). Contudo, esta é uma questão controversa, pois alguns autores acham que o comportamento de imobilidade provocado pela exposição a condições inescapáveis, que não podem ser modificadas pelo comportamento do animal, permite a melhor condição para medir os efeitos de drogas antidepressivas. Portanto, a identificação do papel do desespero

comportamental na performance do nado forçado é uma importante maneira para estabelecer a sua validade de construto (BROWN, 2001; DRUGAN, 2013; NUNES; HALLAK, 2014).

Além disso, faz-se necessário o teste de campo aberto para avaliar a locomoção, para que se detecte falsos positivos nos casos de drogas que aumentem a locomoção, prolongando assim o tempo de tentativa de fuga, assim como os falsos negativos, no caso de drogas sedativas que promovam um menor tempo de tentativa de fuga nos animais. Portanto, o uso do teste de campo aberto objetiva confirmar que todos os resultados obtidos no teste de Porsolt decorrem da ação das drogas com efeito antidepressivo e que as mesmas não agem como estimulantes psicomotores (NUNES; HALLAK, 2014).

Em virtude do que foi mencionado, percebe-se que não se pode adotar nenhum critério isoladamente como definidor de um bom modelo animal de depressão e, verdadeiramente, parece ser inalcançável que um único modelo animal abarque toda a complexidade de uma psicopatologia. Assim sendo, essa ausência de modelos genéticos ou bioquímicos de depressão suscitou o interesse ávido de usar também um modelo de depressão em animais que possa retratar a síndrome a partir da sua etiologia.

Isto posto, a pesquisa ora em discussão se fundamentou em parte nos estudos psicanalíticos de Winnicott (1960) sobre a privação materna ou o abandono materno, nos quais ele aponta os aspectos negativos manifestados ao longo da vida de um indivíduo como tendo uma origem no início da vida. Essas mudanças negativas são expressas como violência, delinquência, nervosismo extremo, ansiedade generalizada, esquizofrenia, depressão etc. (RIZZUTO, 1990). Todos esses aspectos, segundo o autor, originam da relação mãe-bebê ou de quem cuida da criança. Dos três tipos de abandono estudados por Winnicott, destacam-se dois deles, a saber, o abandono simples e o abandono repentino. O primeiro que ele chama de "privação" ocorre por falta de responsabilidade de quem cuida do bebê. Geralmente é constante, e acontece desde o nascimento em diante. Nessa fase, Winnicott relaciona o abandono com a ausência de um relacionamento direto entre a mãe (ou a figura materna) e o bebê. Não é preciso deixar o bebê passar fome: basta não se relacionar com ele, apesar de alimentá-lo. Esse tipo de abandono possui efeitos devastadores. O bebê simplesmente não se desenvolve emocionalmente, apresenta perda de personalidade. Disso pode derivar uma psicose grave, ou uma espécie de apatia que

muitas vezes dá a impressão de deficiência mental (Winnicott, 1984). O abandono repentino, por sua vez, Winnicott denomina-o “deprivação”, o que em português pode ser considerado também como “privação”. Esse tipo ocorre quando, num relacionamento bastante firme entre o bebê e a mãe, esta última desaparece ou morre, ausenta-se por um longo tempo ou ainda entra em depressão grave que a impede de interagir emocionalmente com a criança. Os efeitos oriundos desse tipo de privação materna também são muito danosos ao longo da vida do bebê. Fundamentando-se nesses estudos, os modelos animais de separação materna única e crônica tendem a imitar o abandono repentino. Certos estudos demonstram que os eventos perinatais precoces causam vários distúrbios nos desempenhos cognitivo, emocional e comportamental e que o estresse pós-natal está relacionado com o funcionamento anormal psicossomático visto tardiamente na vida (FARKAS *et al.*, 2009; VETULANI, 2013; BEYER; FREUND, 2017). Isso vai ao encontro dos estudos de Winnicott e aponta o modelo animal de separação materna como, certamente, um modelo mais reprodutível da depressão em humanos (ELLENBROEK, 1998).

Várias mudanças neuroquímicas têm sido também reveladas após o uso da separação materna, tais como mudanças no sistema dopaminérgico mesolímbico e alterações na expressão de neuropeptídeos no encéfalo (da SILVA, 1999; BRAKE *et al.*, 2004; NOVICK *et al.*, 2018). Foi mostrado que a separação drástica leva às reduções dos fatores tróficos e a outros marcadores de plasticidade no encéfalo (BURTON *et al.*, 2007). Embora o modelo animal mais relatado na literatura científica consista em longos períodos de privação intermitentes, o que foi denominado no atual estudo de separação materna crônica (SMC), tem sido relatado também que uma simples privação materna de longa duração (24 horas) retarda o desenvolvimento neurocomportamental de ratos recém-nascidos (ELLENBROEK; DERKS; PARK, 2005) ou uma simples separação materna de um minuto no primeiro dia de vida pode levar a distúrbios na vida adulta (LEHMANN *et al.*, 2002; DARNAUDÉRY *et al.*, 2004). Essa separação em um único dia representa o que o presente estudo denomina separação materna única (SMU). O modelo animal de privação materna, além de mimetizar melhor a depressão em humanos, muitas vezes é considerado como um modelo animal de esquizofrenia (ELLENBROEK, 1998), apoiando assim as ideias de Winnicott, segundo as quais os indivíduos que sofreram privação materna na sua infância apresentarão aspectos negativos ao longo de sua vida.

Desta forma, levando em consideração a grande aceitação do teste de nado forçado como forma de investigar drogas antidepressivas e levando-se em conta o que foi observado sobre o modelo de separação materna como modelo animal que se aproxima da depressão em humanos, foi escolhido o teste de Porsolt para avaliar o efeito do ASE como antidepressivo, mediante fluoxetina como controle positivo; também foram escolhidos os modelos de SMC e de SMU para reforçar o efeito do ASE sobre as mudanças biológicas encontradas em indivíduos acometidos com a depressão.

No presente estudo, nossos dados demonstraram que no grupo dos animais não submetidos à separação (CON), os animais tratados com ASE reduziram o tempo de imobilidade quando submetidos ao teste de Porsolt em comparação aos ratos controles não tratados (Figura 12). Não houve diferença estatística entre os ratos tratados com ASE e os tratados com fluoxetina. Para estabelecer que esse efeito é oriundo apenas das propriedades farmacológicas do ASE, foi necessário submeter esses animais ao teste do campo aberto. Neste teste, não houve nenhuma diferença estatística entre todos os grupos estudados, demonstrando, portanto, que a atividade locomotora não foi alterada em nenhum dos grupos, reforçando que os resultados obtidos não tiveram interferência da atividade locomotora dos animais. Logo, pelo teste do nado forçado representar uma forma de investigação de drogas antidepressivas, pode-se inferir face a esse dado que o ASE pode ter um efeito potencial antidepressivo, visto que reduz o tempo de imobilidade em animais submetidos no teste de Porsolt tal qual a fluoxetina.

No tocante aos animais submetidos à separação materna crônica, o presente estudo mostrou que os animais que não foram tratados com ASE e com fluoxetina, reduziram o tempo de imobilidade (Figura 13) no teste de Porsolt quando comparados aos controles (CON). De acordo com dados da literatura, o menor tempo de imobilidade pode estar associado ao estresse e à ansiedade, em uma situação na qual o animal não possui possibilidade de fuga. Desta forma, o aumento da mobilidade não é interpretado como uma redução do humor depressivo (ou comportamento depressivo), mas sim como um aumento do estresse e da ansiedade que são ocasionados por uma situação nova de estresse (que no presente estudo trata-se do teste de nado forçado), nesses animais que já são deprimidos (SHORS *et al.*, 1999; CALIL *et al.*, 2002).

Conforme já estabelecido na literatura, em situações de estresse ocorre uma elevação dos níveis de noradrenalina (RESSLER E NEMEROFF, 1999; GIUSTINO E MAREN, 2018) e de cortisol (HUETHER *et al.*, 1999; TIWARI, 2018), dessa forma poderíamos sugerir que os ratos submetidos à SMU e SMC provavelmente apresentam o eixo HPA desregulado e os níveis de noradrenalina aumentados, como demonstrado no presente estudo (Figura 20), o que justificaria a maior mobilidade nos animais em ambos os grupos quando comparados ao grupo controle, tornando-se mais ativos, confirmando então essa hipótese. Nosso estudo corrobora com dados anteriormente publicados que demonstraram que em ratos com elevação do estresse, foram observadas respostas e estratégias de fuga, diminuindo assim o tempo de imobilidade (ARBORELIUS E EKLUND, 2007; DANIELS *et al.*, 2009).

Nesse modelo experimental não foram observadas diferenças significativas entre os grupos SMC+ASE e o SMC. Entretanto, evidenciamos que os ratos tratados com fluoxetina (SMC+FLU) obtiveram maior mobilidade quando comparados ao grupo SMC. Estudos demonstram que o extrato aquoso de romã, rico em polifenóis, também não altera o tempo de imobilidade no teste de nado forçado (VALDÉS-SUSTAITA *et al.*, 2017), semelhante ao resultado encontrado no grupo SMC tratado com ASE. Porém, outros polifenóis como o resveratrol e os provenientes do chá verde aumentam a mobilidade dos ratos e ocasionam a inibição do eixo HPA (ZHU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013). Os antidepressivos, como a fluoxetina, por sua vez, também são capazes de reduzir o tempo de imobilidade, alterando o humor depressivo (RODRIGUEZ-LANDA *et al.*, 2018), conforme observado no presente estudo.

Não houve diferença significativa quanto ao tempo de permanência no centro e na periferia nos diferentes grupos estudados, estando de acordo com dados da literatura que demonstram não haver diferença no tempo de permanência na periferia do campo (GEYER *et al.*, 1986; TANAKA *et al.*, 2012; ZUO *et al.*, 2014). Portanto, foi demonstrado que os animais submetidos à separação materna crônica não alteram a atividade locomotora, o que corrobora com dados da literatura (RÉUS *et al.*, 2011). Embora alguns autores tenham demonstrado uma diminuição significativa no tempo de permanência do animal depressivo no centro do campo, podendo ser observada uma diminuição da sua capacidade exploratória (JIN *et al.*, 2018), entende-se que o emprego de diferentes protocolos experimentais para a indução do estresse durante a separação materna, podem justificar algumas das diferenças entre os resultados

encontrados no presente estudo e os dados da literatura, um achado que o estudo de Lehmann e Feldon (2000) antecipou há 18 anos.

Semelhante ao que foi visto com o modelo de SMC, os resultados com o modelo de SMU se repetiram. No entanto aqui, o grupo tratado com fluoxetina demonstrou também uma diferença em comparação com o grupo controle (CON), SMU e SMU+ASE (Figura 14), reforçando o importante efeito desse fármaco na redução do tempo de imobilidade. O tratamento com ASE, mais uma vez, não demonstrou nenhuma diferença no grupo SMU. Ao contrário, o grupo SMU+FLU demonstrou reduzir significativamente o tempo de imobilidade quando comparado com o grupo SMU+ASE, reforçando o que já se discutiu acerca dos animais submetidos à SMC e, em especial, sobre o tratamento com fluoxetina. No que tange ao teste de campo aberto (Figura 15), os resultados corroboram com os que já foram discutidos anteriormente, neste sentido, entende-se que a separação materna não altera, de fato, a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto, concordando com o relato de Réus *et al.* (2011). Nos animais não submetidos à separação materna, o tratamento com ASE reduziu o tempo de imobilidade, assim como a fluoxetina (Figura 12).

Vale ressaltar que a fluoxetina, além de ser um antidepressivo, ainda apresenta efeito ansiolítico (RAZAVI *et al.*, 1996; SONAWALLA *et al.*, 2002). De acordo com alguns autores o menor tempo de imobilidade pode estar relacionado com o estresse e à ansiedade, ocasionados pela nova situação de estresse, proporcionada pelo teste de nado forçado, visto que esses animais já são deprimidos pelo modelo que representam (SHORS *et al.*, 1999; CALIL *et al.*, 2002). Dado o exposto, entende-se que o resultado atribuído à fluoxetina nos animais submetidos à separação materna pode ser o somatório do seu efeito ansiolítico e antidepressivo. Assim sendo, podemos sugerir que o ASE, por apresentar apenas um efeito potencialmente antidepressivo (conforme demonstrado neste estudo nos animais não separados), não aumentou o tempo de imobilidade nestes animais submetidos à SMC, devido à presença do fator ansiedade.

No que se refere às catecolaminas, o presente trabalho investigou a participação da dopamina (DA) e da norepinefrina (NE) em homogenato da glândula adrenal. Com efeito, as catecolaminas são produzidas por neurônios adrenérgicos e dopaminérgicos. Porém, as mesmas também podem ser sintetizadas pelas células cromafínicas, presentes na medula da glândula adrenal em resposta ao estresse

(FREDERICK E STANWOOD, 2009; WILLIAN TANK E LEE WONG, 2014; SPASOJEVIC *et al.*, 2015). A adrenalina (epinefrina) e a NE são liberadas em grandes quantidades na circulação quando comparadas à DA, atuando nas células alvos do sistema nervoso simpático, gerando a resposta ao estresse e diminuindo os sintomas da depressão (HAMER *et al.* 2007; WILLIAN TANK E LEE WONG, 2014).

Os níveis de DA em homogenato da glândula adrenal, no presente estudo, foram significativamente elevados em animais tratados com ASE (CON+ASE) quando comparados com os animais controles (CON) e com os tratados com fluoxetina (CON+FLU). No que concerne aos níveis de NE, o grupo CON+ASE apresentou apenas aumento significativo em comparação ao grupo controle (CON) (Figura 18). A explicação desse importante achado pode ser compreendida tal como será discutido relativamente aos níveis de DA e NE nos grupos dos animais submetidos à separação materna, a seguir.

Os níveis de DA em homogenato da glândula adrenal, no presente estudo, não foram diferentes entre os grupos SMC e controle, uma vez que, a DA é uma catecolamina que não está relacionada com a resposta ao estresse, conseqüentemente não recebendo estímulo para sua produção (WILLIAN TANK E LEE WONG, 2014). Entretanto, o tratamento com ASE e com a fluoxetina aumentou significativamente os níveis de DA em homogenato da glândula adrenal nos grupos SMC+ASE e SMC+FLU quando comparados ao SMC (Figura 19).

No presente estudo, os animais submetidos à SMC demonstraram uma tendência em aumentar os níveis de NE em homogenato da glândula adrenal quando comparados ao controle, demonstrando que o estresse da separação materna pode ter induzido o aumento da síntese de NE pela glândula adrenal, uma vez que, essa glândula promove a liberação de NE e de adrenalina para a circulação em resposta ao estresse (KVETNANSKY *et al.*, 2013). Estudos utilizando modelos animais de estresse demonstraram um aumento da expressão da enzima tirosina hidroxilase na medula da glândula adrenal, aumentando a produção de catecolaminas, e assim sua concentração no plasma (SEROVA *et al.*, 1997, 1998; SPASOJEVIC *et al.*, 2015). Ademais, o tratamento com ASE semelhante ao observado com a fluoxetina reduziu os níveis de NE em resposta ao estresse.

Dados da literatura demonstram que o tratamento crônico com a fluoxetina em ratos que foram submetidos ao estresse diminui a expressão do transportador da NE e aumenta a atividade da enzima tirosina hidroxilase, uma enzima que participa da

síntese das catecolaminas, responsável pela conversão da Tirosina em L-DOPA. Como consequência há um aumento da secreção das catecolaminas, liberando-as na circulação (SPASOJEVIC *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que a fluoxetina ocasiona a síntese e o armazenamento da DA na glândula adrenal, sendo os níveis circulantes dessa catecolamina menores quando comparados aos da NE e da adrenalina, uma vez que a exocitose da mesma é muito menor (WILLIAN TANK E LEE WONG, 2014). No presente estudo, possivelmente em virtude de haver uma maior liberação da NE para a circulação em resposta ao estresse, poderia ocorrer uma redução do conteúdo dessa catecolamina na glândula adrenal, como foi observado nos grupos SMC+ASE e SMC+FLU.

Em seu estudo, Liu *et al.*, (2013) demonstrou que os polifenóis podem interferir com a síntese das catecolaminas, aumentando significativamente seus níveis em amostras de soro de ratos estressados. Nós sugerimos que o aumento dos níveis de DA promovido pelo ASE pode ter sido mediado pelos polifenóis presentes no caroço do açaí (de OLIVEIRA *et al.*, 2015), tendo em vista que evidências da literatura demonstraram que as epigallocatequinas, assim como as catequinas, que também estão presentes no nosso extrato, podem aumentar a síntese das catecolaminas na glândula adrenal, bem como, os seus níveis circulantes, e a capacidade antioxidante (LIU *et al.*, 2013), demonstrando um importante papel para o efeito antidepressivo. Ademais, evidências neuroquímicas revelaram que as proantocianidinas, polifenóis mais prevalentes do ASE (de OLIVEIRA *et al.*, 2015), aumentam os níveis de serotonina, noradrenalina e dopamina em várias regiões cerebrais, sugerindo o papel central do sistema monoaminérgico em seu efeito antidepressivo (XU *et al.*, 2010).

Em relação aos animais submetidos à SMU, os níveis de DA em homogenato da glândula adrenal, no presente estudo, não foram diferentes entre os grupos SMU e controle. Entretanto, o tratamento com ASE aumentou significativamente os níveis de DA em homogenato da glândula adrenal no grupo SMU+ASE quando comparados aos grupos SMU e SMU+FLU (Figura 20). O entendimento desse achado é o mesmo do aumento dos níveis de DA no grupo SMC+ASE conforme explicado anteriormente.

No presente estudo, o grupo SMU demonstrou um aumento significativo dos níveis de NE em homogenato da glândula adrenal quando comparado ao controle, demonstrando que o estresse da separação materna única pode ter induzido o aumento da síntese de NE pela glândula adrenal. Conforme já discutido, esse achado corrobora com os dados da literatura, segundo os quais modelos de animais ao

estresse aumentam a produção de NE e reduzem seu transporte (SEROVA *et al.*, 1997,1998; SPASOJEVIC *et al.*, 2015). Ademais, o tratamento com ASE reduziu os níveis de NE no grupo SMU+ASE, em resposta ao estresse, quando comparados ao grupo SMU. Pela observação dos dados analisados, infere-se que o ASE tem efeito nas aminas biogênicas, em especial, na DA e na NE, por conseguinte, o mesmo provavelmente deve atuar através da liberação da NE para o efeito antidepressivo-símile visto no teste de Porsolt. Salienta-se que o tratamento com fluoxetina, dos animais submetidos à separação materna única, não apresentou nenhuma resposta significativa em relação aos outros grupos.

Na hipótese diastesia-estresse (BEAR *et al.*, 2017) que descreve o desenvolvimento da depressão intimamente ligado eixo HPA desregulado, o CRH faz parte de um grupo de hormônios que participa com destaque no eixo HPA, desempenhando um papel chave nos circuitos que modulam a resposta neurovegetativa e comportamental em situações de estresse (ARBORELIUS *et al.*, 1999; JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018). A administração do CRH no sistema nervoso central de animais de experimentação ocasiona taquicardia, aumento da pressão arterial, ansiedade, perda do interesse na exploração do entorno, diminuição da fome e redução da libido (ARBORELIUS *et al.*, 1999). O uso de um bloqueador dos receptores do CRH, antalarmina, bloqueia essas respostas, diminuindo a ansiedade e aumentando o interesse na exploração do entorno (HABIB *et al.*, 2000). Estudos em humanos com depressão severa mostraram aumento da expressão do RNA mensageiro do CRH no sistema límbico e pequena produção de ACTH após administração de CRH endovenoso, sugerindo uma regulação dos receptores hipofisários por excesso de exposição ao hormônio (BELMAKER e AGAM, 2008).

Neste estudo, os níveis plasmáticos de CRH nos animais tratados com ASE (CON+ASE) foram significativamente reduzidos quando comparados com os grupos controle (CON) e CON+FLU (Figura 21A), sugerindo assim, que o ASE age como um agente protetor contra o estresse. Os níveis plasmáticos de CRH nos animais do grupo SMC não foram significativamente diferentes do controle (Figura 22A). Entretanto, os tratamentos com ASE e fluoxetina, reduziram de forma eficaz os níveis plasmáticos de CRH nos grupos SMC+ASE e SMC+FLU, respectivamente quando comparados ao grupo SMC. O efeito protetor do ASE sobre o aumento dos níveis plasmáticos do CRH induzido pela SMC, corrobora com resultados previamente publicados por outros grupos com diferentes componentes polifenólicos (ARTS; HOLLMAN 2005; LIU *et al.*,

2014), sugerindo que o efeito antidepressivo do ASE pode ser mediado em grande parte pela redução dos níveis de CRH que contribui para a redução da ativação do eixo HPA.

O efeito antidepressivo da fluoxetina também envolve a redução dos níveis de CRH, da hiperatividade do eixo HPA e dos níveis séricos de cortisol, que já foram demonstrados por muitos estudos (DAMJANOSKA *et al.*, 2003; GE *et al.*, 1996). O presente estudo demonstrou pela primeira vez que o ASE possui efeito semelhante ao da fluoxetina na redução da concentração de CRH, demonstrando, assim, que potencialmente pode ser utilizado no tratamento da depressão maior.

Com referência aos níveis plasmáticos de GR, o único achado significativo encontrado diz respeito à diminuição significativa dos níveis desses receptores no grupo CON+FLU em relação ao grupo CON (Figura 21B). Por outro lado, em homogenato de hipotálamo, demonstramos uma redução significativa da expressão dos receptores GRs, nos grupos tratados com ASE e fluoxetina quando comparados com o grupo controle (Figura 30B). Entretanto, não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos CON, CON+ASE e CON+FLU em homogenato de hipocampo (Figura 30A).

Dados da literatura demonstram que pacientes com depressão maior possuem um desequilíbrio na ativação dos receptores RM e GRs (MELLO *et al.*, 2009). No presente estudo, nossos resultados demonstraram que a SMC levou à redução significativa da expressão dos GRs em homogenato de hipocampo e hipotálamo quando comparados com o grupo (CON) (Figuras 31A e 31B). Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos dos GRs entre os grupos estudados. Sendo assim, nossos achados corroboram com dados da literatura, os quais demonstram que animais submetidos ao estresse tem redução desses receptores, desenvolvendo um comportamento depressivo (MEANEY *et al.*, 1996; KARANDEA *et al.*, 2000; PARIANTE E MILLER, 2001; RIDDER, 2005; SUDHEIMER *et al.*, 2013, 2015). Alguns autores também sugerem que o estresse e fatores genéticos, como polimorfismos e mutações, poderiam contribuir para a deficiência dos GRs e a hiperatividade do eixo HPA (VAN ROSSUM; VAN DEN AKER, 2011; DERIJK E DE KLOET, 2005).

Nós demonstramos pela primeira vez, que o efeito antidepressivo do ASE pode ser decorrente do aumento da expressão dos GRs em homogenato de hipotálamo de animais submetidos à SMC, o que poderia contribuir para uma maior ativação desses

receptores no cérebro e para a normalização da hiperatividade do eixo HPA. Entretanto, o tratamento com ASE não alterou a expressão dos GRs no hipocampo, o que poderia ser justificado pelo fato desses receptores serem mais abundantemente encontrados no hipotálamo (DE KLOET *et al.*, 1998;). Acredita-se que esse efeito do ASE seja mediado pelos polifenóis presentes no extrato (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015), os quais em conjunto proporcionariam tal regulação dos GRs. Estudos prévios evidenciaram que o consumo de dietas ricas em polifenóis pode ser inversamente associado ao desenvolvimento dos sintomas da depressão (PATHAK *et al.*, 2013; GODOS *et al.*, 2018). Ademais, foi demonstrado que a *cúrcuma* longa, rica em polifenóis, tem um papel importante na regulação do eixo HPA, principalmente através do aumento da expressão do GR (XU *et al.*, 2007). Em relação aos animais submetidos à separação materna única, o grupo SMU apresentou significativamente menor expressão dos receptores GRs, tanto no hipotálamo quanto no hipocampo, quando comparada ao grupo controle, tal como o grupo SMC. Esse último achado corrobora com dados na literatura que sustentam que o estresse pós-natal leva a uma diminuição de receptores no hipocampo e hipotálamo (ABRAHAM; KOVACS, 2000; RHEES; LEPHART; ELIASON, 2001). Assim sendo, esse dado apoia nossa escolha do modelo experimental de depressão.

Então, sobre esses aspectos, entende-se que o tratamento com ASE demonstrou um efeito mais promissor do que o da fluoxetina sobre o aumento da expressão dos GRs no hipotálamo, resultado diferente do que tem sido demonstrado na literatura em modelos de estresse. Estudos têm demonstrado que um dos importantes mecanismos associados ao efeito antidepressivo de fármacos antidepressivos como a fluoxetina é o aumento dos níveis de GRs, que contribui para a normalização do eixo HPA (JURUENA *et al.*, 2004). Contudo, diferentes protocolos experimentais são empregados para a indução do estresse durante a separação materna, que podem justificar algumas das diferenças entre os resultados encontrados no presente estudo e os dados da literatura. Em conjunto nossos resultados sugerem que o ASE apresenta um efeito modulador sobre o eixo HPA, já que reduz as concentrações plasmáticas do hormônio CRH. Além disso, em animais controle que supostamente, não apresentam o grau de estresse similar ao dos animais submetidos ao modelo de separação materna, o ASE reduz a expressão dos receptores GRs no hipotálamo, enquanto em animais submetidos à separação materna, o ASE atua aumentando a expressão desses receptores.

O BDNF é, sem dúvida, a neurotrofina mais importante, que é principalmente expressa no hipocampo e no córtex (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015), e que desempenha um papel fundamental na sobrevivência e diferenciação de neurônios através de suas ações sobre o seu receptor TrkB (EIDE *et al.*, 1996; FRYER *et al.*, 1997; BINDER e SCHARFMAN, 2004; PHILLIPS, 2017., 2005). Muitos estudos demonstraram que a diminuição dos níveis de BDNF ou um comprometimento da função do seu receptor TrkB são dois fatores de risco para o desenvolvimento da depressão maior (LYONS *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2007). Estudos *post-mortem* têm revelado que o BDNF hipocampal está reduzido em pacientes com depressão maior que cometeram suicídio, mas níveis elevados em pacientes que estavam sendo tratados com agentes antidepressivos, no momento da sua morte (DWIVEDI *et al.*, 2003; KAREGE *et al.*, 2005; BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015)

Os animais tratados com ASE (CON+ASE) e fluoxetina (CON+FLU) não apresentaram nenhuma diferença estatística quanto à expressão do pró-BDNF (Figura 27A) e do BDNF (Figura 27B) entre si e quando comparados com o grupo controle (CON). Entretanto, a expressão do receptor TrkB nos animais tratados com ASE (CON+ASE) foi significativamente aumentada em comparação aos grupos CON e CON+FLU (Figura 25), sugerindo que ASE pode atuar da via TrkB/CREB/BDNF, pois o aumento dos receptores TrkB pode levar a uma maior ativação da via, mesmo em face de quantidade reduzida de BDNF (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015; QI *et al.*, 2017; RANG *et al.*, 2016). Os animais do grupo SMC apresentaram uma significativa redução na expressão do BDNF em homogenato de hipocampo (Figuras 28A e B), confirmando que o estresse crônico pode levar a redução do conteúdo proteico desse fator neurotrófico, contribuindo para a atrofia dos neurônios que, por conseguinte, altera os neurotransmissores e hormônios envolvidos no controle da produção das neurotrofinas (LIU *et al.*, 2000; ROCERI *et al.*, 2002). Dados da literatura demonstram que uma alteração no eixo HPA ocasiona o aumento da produção de cortisol e o comprometimento das funções cerebrais principalmente do hipotálamo e hipocampo, o que reflete diretamente na redução da expressão do BDNF, impedindo assim a neurogênese e a neuroplasticidade (ROCERI *et al.*, 2002; WORKEL *et al.*, 2001). Nossos resultados também demonstraram que os grupos SMC tratados ou não tiveram uma redução da expressão do pró-BDNF. Dados da literatura demonstram que níveis elevados desse precursor do BDNF podem ocasionar a apoptose das células cerebrais (LU *et al.*, 2005; ZAGREBELSKY *et al.*, 2005).

No presente estudo, os animais submetidos à SMU apresentaram expressão de BDNF reduzida no hipocampo e o tratamento com ASE aumentou significativamente essa expressão, entretanto, não houve alteração nos níveis do receptor TrkB em homogenato de hipocampo. No entanto, o tratamento com ASE não alterou significativamente a expressão do BDNF nos animais submetidos à SMC, entretanto, aumentou significativamente os níveis do receptor TrkB em homogenato de hipocampo, que possui um importante papel na regulação dos efeitos promovidos por esse fator neurotrófico. Este resultado é reforçado por dados da literatura que demonstram que os polifenóis exercem seu efeito neuroprotetor através da ativação da via TrkB/CREB/BDNF (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015; QI *et al.*, 2017), demonstrando o importante papel dos polifenóis presentes no ASE para o seu efeito antidepressivo.

Através da avaliação dos resultados encontrados, pode-se inferir que o tratamento com ASE demonstrou um efeito mais promissor do que o da fluoxetina em aumentar os níveis do receptor TrkB no hipocampo. Em contrapartida a fluoxetina, diferentemente do observado com o ASE, aumentou significativamente a expressão do BDNF (Figuras 26 e 29), corroborando com dados da literatura que demonstram que os antidepressivos são capazes de reverter a redução dos níveis de BDNF em modelos experimentais de estresse (WEI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018). Dessa forma, sugere-se que o ASE e a fluoxetina interferem com a ação desse fator neurotrófico de maneiras distintas.

A inibição da PDE tem sido estudada como alvo no tratamento da depressão (PATEL; ANAND; BHATT, 2012). Em nosso estudo, a expressão da PDE5 não foi significativamente modificada entre os grupos controles, tanto no hipocampo quanto no hipotálamo (figuras 33A e B). Nos animais submetidos à SMC, apenas o grupo SMC apresentou menor expressão da PDE5 em relação ao grupo controle, em ambas as amostras. O tratamento com ASE não alterou a expressão da PDE5 em nenhuma amostra (Figuras 34A e B). Resultado semelhante foi observado no modelo de SMU, no entanto, apenas a expressão da PDE5 na amostra do hipotálamo mostrou-se menor no grupo SMU, em comparação ao grupo CON (Figuras 35A e B). O tratamento com ASE não foi efetivo. Esses achados em relação à enzima PDE5 podem ser explicados pela distribuição das fosfodiesterases no encéfalo, pois aquelas mais expressas no encéfalo são PDE1,4,7,8,9 e 10 (BRAND; MOLLER; HARVEY, 2015) e a PDE5 é mais expressa no coração, pulmão e no músculo liso.

Considerando a conexão existente entre a inflamação, NO e sinalização de insulina/PPAR na depressão maior (WAKU *et al.*, 2010), não é de se admirar que o ligante endógeno do PPAR γ , 15d-PGJ2, apresente propriedades anti-inflamatórias (SCHER; PILLINGER, 2005). Além disso, o mesmo também aumenta o metabolismo neuronal da glicose, previne a supressão da captação de glutamato induzida pelo estresse (GARCÍA-BUENO *et al.*, 2007) e tem sido sugerido como possível marcador de doenças psiquiátricas (GARCÍA-BUENO *et al.*, 2005). De fato, estudos em animais também descreveram a atividade antidepressiva dos agonistas do PPAR γ (EISSA AHMED; AL-RASHEED; 2009).

No presente estudo, a expressão do PPAR γ não diferiu entre os grupos controle, CON+ASE e CON+FLU (Figuras 36A e B), tanto em homogenato do hipocampo quanto em homogenato do hipotálamo. A expressão do PPAR γ não apresentou nenhuma alteração significativa entre os grupos dos animais submetidos à SMC quando investigada em amostra de homogenato do hipocampo. Entretanto, no hipotálamo, o tratamento com ASE elevou a expressão do receptor PPAR γ no grupo SMC+ASE quando comparado com os grupos SMC e SMC+FLU (Figura 37B). Esse dado sugere que em situação de estresse crônico, o ASE tende a aumentar o conteúdo proteico do receptor PPAR γ , o que pode ser útil na depressão, uma vez que a provável participação do PPAR γ na depressão está relacionada com sua ativação por agonistas, promovendo seus importantes efeitos biológicos (descritos acima) que são benéficos ao tratamento dessa comorbidade. Portanto, como o ASE aumenta sua expressão, podemos sugerir que sua ação antidepressiva pode envolver a ativação do receptor PPAR γ , podendo no futuro ser utilizado com um agonista do PPAR γ . Dessa forma, demonstramos pela primeira vez que o ASE tem efeito sobre o receptor PPAR γ , o que pode contribuir para o tratamento antidepressivo. No tocante aos grupos submetidos à SMU, não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos estudados.

Schiavone, Colaianna e Curtis (2015) sugerem que o estresse no início da vida, tal como a separação materna, pode levar ao estresse oxidativo pelo aumento da produção de EROs e ERNs, assim como através da redução das defesas antioxidantes. Considerando a importante propriedade antioxidante do ASE já descrita pelo nosso grupo, em modelos experimentais de hipertensão (ROCHA *et al.*, 2007; da COSTA *et al.*, 2012), diabetes (DE BEM *et al.*, 2017) e obesidade (DE OLIVEIRA *et*

al. 2015), investigamos um possível efeito do extrato sobre o estresse oxidativo nos modelos de SMC e SMU.

A escolha do tronco encefálico como tecido de amostragem para a investigação do estresse oxidativo fundamenta-se nas seguintes razões: os sistemas monoaminérgicos, compostos por neurônios que liberam DA, NE e 5-HT, se originam em pequenos núcleos no tronco encefálico (mesencefálico) e projetam-se difusamente pelo córtex e sistema límbico. Os neurotransmissores liberados por esses neurônios estão envolvidos na regulação da atividade psicomotora, apetite, sono e humor (BEAR *et al.*, 2017). A serotonina (5-HT) tem sido descrita como um neurotransmissor modulatório amplamente distribuído no sistema nervoso central, e seus neurônios serotoninérgicos estão localizados nos núcleos da rafe que se consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios do tronco encefálico. Algumas regiões do tronco encefálico, como o núcleo do trato solitário e a região rostro-ventro-lateral do bulbo têm sido apontadas como principais áreas no controle da atividade simpática (BEAR *et al.*, 2017). Chan *et al.* (2009) demonstraram que esse controle da atividade simpática pode sofrer influência da produção de EROS, pois mostraram que o aumento de EROS induzido pela disfunção mitocondrial em conjunto com a diminuição da ação das enzimas antioxidantes SOD e catalase no tronco encefálico, especificamente na região rostro-ventro-lateral do bulbo, contribuem para o desenvolvimento do estresse oxidativo crônico nesta região, levando a hiperatividade simpática.

A membrana plasmática é suscetível à ação das EROs, que promovem peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (VAN DER KRAAIJ *et al.*, 1988). Em consequência, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas e formação de subprodutos citotóxicos, como o MDA, culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). Portanto, o excesso de tais produtos pode ser nocivo (ROSS & MOLDEUS, 1991). Estudos mostram que antidepressivos como a fluoxetina, imipramina e venlafaxina revertem significativamente a lipoperoxidação induzida pelo estresse (ABDEL-SHALAM *et al.*, 2011; SCHIAVONE; COLAIANNA; CURTIS, 2015, HO *et al.*, 2016).

Nossos estudos demonstraram que os níveis de MDA, assim como a carbonilação de proteínas estão aumentados no tronco encefálico de animais submetidos à SMC; em relação aos animais submetidos à SMU, apenas a carbonilação de proteínas está aumentada. Estes resultados sugerem que a

separação materna é uma condição que pode gerar dano oxidativo, pela peroxidação de lipídeos de membranas e danos às proteínas. Em animais submetidos à SMC e tratados com ASE (SMC+ASE), os níveis de MDA, como a carbonilação de proteínas foram reduzidos quando comparados com o grupo SMC, assim como os níveis de carbonilação em animais submetidos à SMU. O tratamento com fluoxetina também demonstrou reduzir os níveis de MDA nos grupos SMC+FLU quando comparados com o grupo SMC, mas não reduziu a carbonilação das proteínas. Estes resultados sugerem que o ASE reduz com mais eficácia o dano oxidativo do que a fluoxetina, pois além de promover a redução da peroxidação lipídica, tal qual a fluoxetina, também reduz a carbonilação de proteínas. Esses dados ganham destaque quando comparados aos achados de Sacchet *et al.* (2015), os quais confirmam que tanto a fluoxetina como a *Plinia trunciflora* (jabuticaba), rica em polifenóis, atenuam a lipoperoxidação em homogenato de cérebros de camundongos.

O estresse crônico do modelo de separação materna pode alterar sistemas antioxidantes e ativar enzimas responsáveis pela remoção de EROs, como a SOD e a catalase, além de reduzir GPx, indicando uma resposta celular à elevação na formação de EROs (ABDELWAHAB *et al.*, 2011), estabelecendo-se assim o estresse oxidativo, através do desbalanço entre a produção de espécies reativas e a sua remoção pelas enzimas antioxidantes.

Os resultados do presente estudo mostraram que tanto os animais submetidos à SMC como à SMU apresentaram atividade reduzida das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx em homogenato de tronco encefálico, comparativamente ao grupo controle (CON), o que sugere uma defesa antioxidante reduzida induzida pela separação materna, corroborando com dados da literatura (SCHIAVONE; COLAIANNA; CURTIS, 2015). Considerando os achados de dano oxidativo aumentado, medido pelos níveis de MDA e carbonilação de proteínas e da defesa antioxidante reduzida, podemos sugerir que os animais que sofreram um estresse no início da vida podem apresentar alterações fisiológicas que culminam em estresse oxidativo (HO *et al.*, 2016). O tratamento tanto dos animais submetidos à SMC como SMU com ASE aumentou a atividade das três enzimas em comparação com os grupos SMC e SMU (Figura 41B).

Por outro lado, a fluoxetina aumentou apenas as atividades da catalase e GPx em animais submetidos à SMC. As atividades reduzidas da SOD, catalase e GPx em animais submetidos à SMU e da SOD em SMC não foram alteradas pelo

antidepressivo. Esse dado corrobora com o estudo de Sacchet *et al.* (2015) que demonstrou que a fluoxetina não alterou as atividades da SOD e GPx em modelo experimental de depressão quando comparada aos animais controles. Neste mesmo estudo, os autores não observaram nenhum efeito do extrato hidroalcoólico da *plinia trunciflora* sobre as atividades da SOD e da GPx; entretanto, tanto a fluoxetina como a *plinia trunciflora* aumentaram apenas a atividade da catalase (SACCHET *et al.*, 2015). Assim sendo, nossos achados, além de corroborar com dados na literatura, também mostram que o ASE tem maior efeito antioxidante quando comparado à fluoxetina e, por exemplo, à *plinia trunciflora*.

Entretanto, outros estudos demonstram que a fluoxetina aumenta a atividade da SOD (Réus *et al.*, 2010; ABDEL-SALAM *et al.*, 2011). Esse paradoxo, pode ser oriundo do tipo de metodologia para a avaliação do estresse oxidativo empregadas pelos autores.

Portanto, no presente estudo, demonstramos pela primeira vez, que o ASE exerce ação antioxidante no SNC, pela redução do dano oxidativo gerado pelas EROs e pelo aumento da atividade antioxidante enzimática no tronco encefálico, o que pode contribuir para seu efeito antidepressivo. É importante ressaltar que o melhor desempenho do ASE como antioxidante face à fluoxetina, o que deve ser atribuído aos polifenóis que compõem o extrato.

Existem evidências de que a depressão apresenta sinais aumentados de estresse oxidativo e que há participação da via L-Arginina-cGMP-NO na sua patogenia. O estresse oxidativo é a causa central de vários sintomas da depressão (TORRES *et al.*, 2004). O NO desempenha diversas funções fisiológicas importantes (EISERICH *et al.*, 1998), porém quando em excesso, o NO pode exercer efeitos nocivos. Em determinadas condições, o NO e o $\cdot\text{O}_2$ podem interagir, resultando na formação de ONOO^- , um produto extremamente tóxico, capaz de reagir com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as (WANG *et al.*, 2009). Pesquisadores têm focado nas alterações potenciais do NO, por exemplo, em condições patológicas como a depressão (GARG *et al.*, 2008). O nitrito (metabólito estável do NO) pode ser associado com a fisiopatologia da depressão, uma vez que elevados níveis de ONOO^- , e seu precursor, o NO, tem sido bem documentado na fisiopatologia da depressão induzida pelo estresse (WEGENER *et al.*, 2010; RICHARD *et al.*, 2007; SANDERS & KORF, 2007; PALL, 2007). Outros

achados demonstraram que a inibição da NOS exerce efeitos antidepressivos em modelos animais de depressão (Da SILVA *et al.*, 2000; YILDIZ *et al.*, 2000).

No presente estudo, os níveis de nitrito estão significativamente reduzidos nos grupos SMC e SMU em comparação com o grupo controle, o que corrobora com a literatura. A medida dos níveis de nitrito nos animais SMU e SMC, reflete as mudanças na produção de NO nesse modelo de depressão. A redução dos níveis de nitrito no tronco encefálico correlaciona com os níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas elevados e atividade antioxidante reduzida nesse modelo de depressão. O aumento significativo dos níveis de nitrito no grupo SMC+ASE em relação ao grupo SMC demonstra que o ASE é capaz de aumentar a biodisponibilidade do NO, provavelmente pelo seu efeito antioxidante, reduzindo a formação de peroxinitrito, aumentando assim a biodisponibilidade do óxido nítrico. É possível ainda, que o ASE também estimule a produção de NO no SNC, assim como foi demonstrado pelo nosso grupo, em células endoteliais em cultura (Rocha *et al.*, 2008).

CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que o ASE é capaz de reduzir o tempo de imobilidade no teste de nado forçado em animais normais submetidos ao teste de Porsolt e de melhorar vários parâmetros importantes alterados pela separação materna, por exemplo, reduzindo os níveis plasmáticos de CRH e aumentando os níveis de DA em homogenato da glândula adrenal, elevando o número de receptores dos glicocorticoides, do TrkB, em homogenato de hipocampo e hipotálamo respectivamente, e dos receptores PPAR γ e GR no hipotálamo. O ASE mostrou exercer uma importante ação antioxidante no SNC, já que reduziu a lipoperoxidação e a carbonilação de proteínas, sugerindo um efeito inibitório sobre o dano oxidativo. Além disso, o ASE aumentou a atividade das enzimas antioxidantes em homogenato do tronco encefálico e elevou os níveis de nitrito, sugerindo que o extrato é capaz de aumentar a defesa antioxidante, proporcionando um aumento da biodisponibilidade do NO. Estes efeitos benéficos em conjunto podem ser atribuídos aos polifenóis presentes no extrato que atuam sinergicamente, contribuindo para aumentar a neuroplasticidade e para normalização do eixo HPA, promovendo assim seu efeito antidepressivo.

Efeitos semelhantes foram observados no tratamento com a fluoxetina, ressaltando que diferente do ASE o inibidor seletivo da recaptação de serotonina aumentou os níveis plasmáticos do CRH e a expressão do BDNF em homogenato de hipocampo, e não alterou os níveis dos GRs em homogenato de hipotálamo. A fluoxetina também não foi capaz de aumentar a atividade das enzimas SOD e da GPx, e tampouco de reduzir a carbonilação de proteínas, o que nos permite sugerir que o ASE e a fluoxetina podem atuar por mecanismos distintos para promover cada qual seu efeito antidepressivo.

Quanto ao modelo experimental utilizado em nosso estudo, estabelecemos que a separação materna leva à redução da expressão de BDNF, dos receptores PPAR γ e GR no hipocampo e hipotálamo, além do aumento do dano oxidativo e redução da atividade antioxidante, caracterizando o estresse oxidativo. Os nossos dados apontam uma possibilidade futura do uso do modelo de separação materna como um modelo animal de estresse oxidativo.

Ao comparar o nosso extrato com a fluoxetina, fármaco com efeito já bem estabelecido no tratamento da depressão maior, constatamos que o ASE possui

ações similares e em alguns parâmetros bioquímicos mais promissores do que às do fármaco em questão. Desta forma, esse estudo abre uma possibilidade para a utilização do ASE, como uma ferramenta terapêutica para o tratamento da depressão

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, B.A.; SALAMA, R.H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v.100, n.1, p.59-65, 2011.
- ABELAIRA, H. M.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Rev Bras Psiquiatr**, v.35, s.2, s.112-20, 2013.
- ABRAHAM, I. M.; KOVACS, K. J. Postnatal handling alters the activation of stress-related neuronal circuitries. **Eur J Neurosci**, v.12, p.3003-3014, 2000.
- ALTAR, C. A. et al. Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. **Biol Psychiatry**, n.54, n.703–709, 2003.
- ALTAR, C. A. Neurotrophins and depression. **Trends Pharmacol Sci**, v.20, p59–61, 1999.
- ALVES, A.C.S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Rev. bras. plantas med**, v.16, n.3, p.593-606, 2014.
- American Chemical Society (**ACS**). Molecule of the Week Archive: Rolipram (June 06, 2016) I failed against depression, but I may succeed against Alzheimer's. What molecule am I? <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/r/rolipram.html/> acesso em: 04/06/2018.
- AMOROSO, S. et al. Ca (2p)-independent caspase- 3 but not Ca(2p)-dependent caspase-2 activation induced by oxidative stress leads to SH-SY5Y human neuroblastoma cell apoptosis. **J Neurosci Res**, v.68, p.454–462, 2000.
- ARBORELIUS, L. et al. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **J Endocrinol**, v.160, n.1, p.1-12, 1999.
- ARBORELIUS, L.; EKLUND, M. B. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. **Neuroscience**, v. 145, n. 2, p. 738–750, 2007.
- ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 317S-325S, 2005.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA. Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-5. 5ª Edição, p.155-187, Washington: **American Psychiatric Association**, 2014.
- ATKINS, C. M. et al. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. **Nat. Neurosci**, v.1, p.602–609, 1998.

BAIMA, C; GRANDELLE, R: Brasil é o país mais deprimido da América Latina, aponta **OMS**. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/sociedade/saude/brasil-o-pais-mais-deprimido-da-america-latina-aponta-oms-20969009>>. Acesso em: 24/05/2018.

BAINS, J. S.; CUSULIN, J. I.; INOUE, V. V. (2015). Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. **Nat Rev Neurosci**, v.16, p.377–388, 2015.

BAJ, G. et al. Physical Exercise and Antidepressants Enhance BDNF Targeting in Hippocampal CA3 Dendrites: Further Evidence of a Spatial Code for BDNF Splice Variants. **Neuropsychopharmacology**, v.37, n.7, p.1600-1611, 2012.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n.5, p.431-441, 2005.

BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; HANS, T. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO Journal**, V.1, n.5, p.549-553, 1982.

BARKER, D.J. *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v.298, p. 564–567, 1989.

BAUMGARTNER, A.; GRAF, K. J.; KUTEN, I. The dexamethasone suppression test in depression, in schizophrenia, and during experimental stress. **Biol Psychiatry**, v.20, p.675–679, 1985.

BEAR, M.F. *et al.* Neurociências: desvendando o Sistema nervosa. 4.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 1016 p.

BECK, A. *Cognitive therapy and emotional disorders*. New York: **Int. Univ. Press**, 1976.

BELLÓ, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: Marroni, NP. et al. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. Porto Alegre: **Editora Ulbra**, p.15-19, 2002.

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major Depressive Disorder. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 358, n. 1, p. 55–68, 2008.

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major Depressive Disorder. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 358, n. 1, p. 55–68, 2008.

BERK, M. et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav Rev**, v.35, p.804–17, 2011.

BILIA, A.R.; GALLORI, S; VINCIERI, F. F. St. John's wort and depression: Efficacy, safety and tolerability-an update. **Life Sciences**, v.70, n.26, p.3077-3096, 2002.

BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. Brain-derived Neurotrophic Factor. **Growth Factors**, v.22, n.3, p.123–131, 2004.

BOBBIO, F.O. et al. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterp oleracea* Mart). **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.20, p.388-390, 2000.

BOBON, D. et al. Is phosphodiesterase inhibition a new mechanism of antidepressant action? A double blind double-dummy study between rolipram and desipramine in hospitalized major and/or endogenous depressives. **Eur Arch Psychiatry Neurol Sci**, v.238, p.2-6, 1988.

Bolger, G. B. The PDE4 cAMP-Specific Phosphodiesterases: Targets for Drugs with Antidepressant and Memory-Enhancing Action. **Adv Neurobiol**, v.17, p.63-102, 2017.

BONFIGLIO, J. J. *et al.* The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. **Neuroendocrinology**, v.94, n.1, p.12-20, 2011.

BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C. P. Phosphodiesterase inhibitors. **Br J Pharmacol**, v.147, s.1, s.252-257, 2006.

BRAND, S. J.; MOLLER, M.; HARVEY, B. H. A Review of Biomarkers in Mood and Psychotic Disorders: A Dissection of Clinical vs. Preclinical Correlates. **Curr Neuropsychopharmacol**, v.13, n.3, p.324-368, 2015.

BRIGITTA, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues Clin Neurosci**, v.4, p.7-20, 2002.

BROWN, P.L.; HURLEY, C.; REPUCCI, N.; DRUGAN, R.C. Behavioral analysis of stress controllability effects in a new swim stress paradigm. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.68, p.263-272, 2001.

BRUNTON, L.L; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 13th Edition. New York, McGraw-Hill Education, 2017. 1440 p.

BURTON, E. M. et al. A prospective test of the stress-buffering model of depression in adolescent girls: No support once again. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v.72, p.689–697, 2004.

CAI, H.; Harrison, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidative stress. **Circ Res**, v.87, p.840, 2000.

CALIL, C.M. et al. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 4, 2002.

CALIXTO, J.B. Twenty-Five Years of Research on Medicinal Plants in Latin America: A Personal View. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CALOGERO, A. E. et al. Treatment of lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction. **Aging Male**, p.1-9,2018.

CAMPOS, S. D. S.; BOVI, M. L. A.; IADEROZA, M. Characterization of palm heart harvested from several crossing combinations between *E. oleracea* Mart and *E. edulis* Mart growing under different conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 637–646, 1991.

CAREY, A. N. et al. Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 238–245, 2017.

CARLINI, E. L.; NAPPO, S. A. The pharmacovigilance of psychoactive medications in Brazil. **Rev Bras Psiquiatr**, v.25, n.4, p.200-5, 2003.

CHANCE, B.; SIES, H; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev.**, v.59, n.3, p.527-625, 1979.

CHEN, B. et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, n.50, p.260–265, 2001.

CHUNG, C. P. et al. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. **Psychiatry Research**, v.206, p.213–216, 2013.

CID-10 - OMS Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: **World Health Organization**; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

COISSON, J. D. et al. Variable foraging demand rearing: sustained elevations in cisternal cerebrospinal fluid corticotropin-releasing factor concentrations in adult primates. **Biol Psychiatry**, v.50, n.3, p.200-204, 2001.

COPPEN, A. Depression and tetrahydrobiopterin: the folate connection. **J Affect Disord**, v.16, n.2-3, p.103-7, 1989.

CORDEIRO, V.S.C. Efeito do extrato hidroalcoólico do açai (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre as alterações cardiovasculares em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) / Viviane da Silva Cristino Cordeiro. 2012, **Dissertação de mestrado submetida à Pós-graduação em Biologia**, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - **UERJ**, 100p.

CORRELL, C.U.; SCHRIDAN, E.M.; DELBELLO, M.P.; Antipsychotic and mood stabilizer efficacy and tolerability in pediatric and adult patients with bipolar I mania: a comparative analysis of acute randomized, placebo-controlled trials. **Bipolar Disorder**. v. 12, p. 116-141, 2010.

COTTER, D. et al. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. **Cereb Cortex**, v.12, p.386–394, 2002.

CREGAN, S.P. et al. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. **J Cell Biol.**, v.158, n.3, p.507-517, 2002.

- DA COSTA, C.A. Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre a disfunção endotelial, estresse oxidativo e alterações vasculares e renais associados à hipertensão renovascular dois rins, um clipe (2R,1C). 2012, **Tese de doutorado submetida à Pós-graduação em Biologia**, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ, 121p.
- DA SILVA, G. et al. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tailsuspension test in mice. **NeuroReport**, v.11, p.3699–3702, 2000.
- DAMJANOSKA, K. J. et al. Chronic fluoxetine differentially affects 5-HT_{2A} receptor signaling in frontal cortex, oxytocin and corticotropin releasing factor (CRF)-containing neurons in rat paraventricular nucleus. **J Pharmacol Exp Ther**, v.306, p.563–571, 2003.
- DANIELS, W. et al. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 17 glucocorticoid receptor promoter region. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 4, p. 615–627, 2009.
- DANTZER, R. et al. Inflammation associated depression: from serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, v.36, n.3, p.426–436, 2011.
- DARNAUDÉRY, M. *et al.* Early and later adoptions differently modify mother-pup interactions. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 3, p.590-6, 2004.
- DE BEM, G. F., DA COSTA, C. A., DA SILVA CRISTINO CORDEIRO, V., SANTOS, I. B., DE CARVALHO, L. C. R. M., DE ANDRADE SOARES, R., DE MOURA, R. S. *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seed extract associated with exercise training reduces hepatic steatosis in type 2 diabetic male rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2017.
- DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.
- DE OLIVEIRA P.R, DA COSTA C.A, DE BEM G.F. *Euterpe oleracea* Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PLoS One**, v.10, n.12, 2015.
- DE OLIVEIRA, P. R.; DA COSTA, C.A.; DE BEM, G.F. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 56: p. 619-26, 2010.
- DERIJK, R.; DE KLOET, E. R. Corticosteroid Receptor Genetic Polymorphisms and Stress Responsivity. **Endocrine**, v. 28, n. 3, p. 263–270, 2005.
- DEVAN, B. D. et al. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition and cognitive enhancement. **Drugs Future**, v.30, p.725, 2005.

- DIAS, B. G. et al. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. **Neuropharmacology**, v.45, p.553–563, 2003.
- DIAZ-VIVANCOS, P. et al. Glutathione – linking cell proliferation to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.89, p.1154 – 1164, 2015.
- Drugan RC, Christianson JP, Warner TA, Kent S. Resilience in shock and swim stress models of depression. **Front Behav Neurosci**. 2013 Feb 28;7:14.
- Drzyzga, L. R.; Marcinowska, A.; Obuchowicz, E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. **Brain Res Bull**, v.79, p.248-257, 2009.
- Du, J et al. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. **P Natl Acad Sci USA**, v.106, n.9, p.3543-8, 2009.
- DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. Adaptations of receptor coupled signal transduction pathways underlying stress- and drug induced neural plasticity. **J Nerv Ment Dis**, v.182, p.692-700, 1994.
- DWIVEDI, Y. et al. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.60, p. 804-815, 2003.
- EIDE, F. F. et al. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. **J Neurosci**, v.16, p.3123–3129, 1996.
- EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v.19, p.221-357, 1998.
- EISSA AHMED, A. A.; AL-RASHEED, N. M. Antidepressant-like effects of rosiglitazone, a PPAR-gamma agonist, in the rat forced swim and mouse tail suspension tests. **Behav. Pharmacol.**, v.20, p.635, 2009.
- ELLENBROEK, B.A.; VAN DEN KROONENBERG, P.T.; COOLS, A.R. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. **Schizophr Res**, v. 30, n. 3, p. 251-60, 1998.
- ERNFORS, P. et al. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. **Neuron**, v.7, p.165-176, 1991.
- ETKIN, A. A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. **Neuron**, v.50, p.127–143, 2006.
- Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**. 2005;38:893–897, 2005.

EVANS, W.C. Orders and families of medicinal plants; animal-derived drugs. In: Evans, W.C. *Pharmacognosy*. (Ed.) **Trease and Evans pharmacognosy**. 14th ed. Philadelphia: wB Saunders, cap. 2, p.28-55, 1996.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. **Fundam Clin Pharmacol**, v.30, n.3, p.198-215, 2016.

FARKAS, J. *et al.* Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. **Brain Res Bull**, jan 15, 2009.

FARKAS, J. *et al.* Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. **Brain Res Bull**, jan 15, 2009.

FEINSTEIN, L. Inequality in the Early Cognitive Development of British Children in the 1970 Cohort. **Economica**, v.70, n.277, p.73-97, 2003.

FOLEY, K. F.; DESANTY K. P.; KAST, R. E. Bupropion: pharmacology and therapeutic applications. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 6, n. 9, p. 1249 – 1265, 2006.

FREDERICK, A. L.; STANWOOD, G. D. Drugs, Biogenic Amine Targets and the Developing Brain. **Developmental Neuroscience**, v.31, n.1-2, p.7–22, 2009.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. **J Biol Chem.**, v.272, p.18515-1851, 1997.

FRYER, R. H.; KAPLAN, D. R.; KROMER, L. F. Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. **Exp Neurol**, v.148, p.616–627, 1997.

GARCÍA-BUENO, B. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on brain glucose and glutamate transporters after stress in rats. **Neuropsychopharmacology**, v.3, p.1251-1260, 2007.

GARCÍA-BUENO, B. The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 decreases oxidative/nitrosative mediators in brain after acute stress in rats. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.180, p.513-522, 2005.

GARG, R.; KUMAR, A. Possible role of citalopram and desipramine against sleep deprivation-induced anxiety like-behavior alterations and oxidative damage in mice. **Indian J Exp Biol.**, v.46, n.11, p.770-776, 2008.

GARTSIDE, S. E. et al. Altered glucocorticoid rhythm attenuates the ability of a chronic SSRI to elevate forebrain 5-HT: implications for the treatment of depression. **Neuropsychopharmacology**, v.28, n.9, p.1572-8, 2003.

GARZÓN, G. A. et al. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, v217, p.364-372, 2017.

GAVIOLI, E. C.; CALO, G. Nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists as innovative antidepressant drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, n. 1, p.10 - 25, 2013.

GAVIOLI, E. C.; CALO, G. Nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists as innovative antidepressant drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, n. 1, p.10 - 25, 2013.

GE, X. et al. The developmental interface between nature and nurture: A mutual influence model of child antisocial behavior and parent behaviors. **Developmental Psychology**, v.32, p.574–589, 1996.

GEHRMANN, W.; ELSNER, M.; LENZEN, S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells. **Diabetes Obes Metab.**, v.12, s.2, p.149–158, 2010.

GEYER, M. A.; RUSSO, P. V.; MASTEN, V. L. Multivariate assessment of locomotor behavior: Pharmacological and behavioral analyses. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 25, n. 1, p. 277–288, 1986.

GILLESPIE, C.F.; NEMEROFF, C. B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosom Med**, v.67, s.26- 28, 2005.

GIUSTINO, T. F.; MAREN, S. Noradrenergic Modulation of Fear Conditioning and Extinction. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 2018.

GODOS, J. et al. Dietary Polyphenol Intake and Depression: Results from the Mediterranean Healthy Eating, Lifestyle and Aging (MEAL) Study. **Molecules**, v.23, n.5, p.999, 2018.

GONÇALVES, M. **Depressão em patologias orgânicas – o melhor é prevenir.** Psychiatry on line Brasil, v.16(12), 2011. Disponível em: <<http://www.polbr.med.br/ano11/prat1211.php>>. Acesso em: 24/05/2018.

GOULDING, M.; SMITH, N. Palms: palms in Amazon wetland. In: Sentinels for Amazon Conservation. **Amazon Conservation Association**. Missouri Botanical Garden Press, St.Louis, p. 121–146, 2007.

GU, L. et al. Role for monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of ethanol extracts from *Hemerocallis citrina*, **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, n.3, p.780-787, 2012.

GUO, J. et al. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components in vivo. **Phytomedicine**, v.18, n.14, p.1250-1254, 2011.

GUO, Z. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. **J. Biol. Chem**, v.283, N.3, P.1754-1763, 2008.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L. et al. Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. **Life Sciences**, v.128, p.24-29, 2015.

HAAPASALO, A. et al. Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. **J Biol Chem**, v.277, p.43160–43167, 2002.

HAAPASALO, A. et al. Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB. TK +-mediated cell survival. **Biochem Biophys Res Commun**, v.280, p.1352–1358, 2001.

HABIB, K. E. et al. Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. **PNAS**, v.97, n.11, p.6079-6084, 2000.

HALENE, T. B.; SIEGEL, S. J. Antipsychotic-like properties of phosphodiesterase 4 inhibitors: evaluation of 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone (RO-20-1724) with auditory event-related potentials and prepulse inhibition of startle. **J Pharmacol Exp Ther**, v.326, n.1, p.230–239, 2008.

HALLIWELL, B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radic Res**, v.31, n.4, p.261-72, 1999.

HAMER, M., TANAKA G, OKAMURA H, TSUDA A AND STEPTOE A. The effects of depressive symptoms on cardiovascular and catecholamine responses to the induction of depressive mood. **Biological Psychology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 20–25, 2007.

HECK, D. E. et al. Mechanisms of oxidant generation by catalase. **Ann N Y Acad Sci**, v.1203, p.120-5, 2010.

HECK, D. E. et al. Mechanisms of oxidant generation by catalase. **Ann N Y Acad Sci**, v.1203, p.120-5, 2010.

HEIM, C.; NEMEROFF, C.B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorder: preclinical and clinical studies. **Soc. Biol. Psychiatry**, v. 49, p.1023–1039, 2001.

HENEKA, M. T.; LANDRETH, G. E. PPARs in the brain. **Biochim Biophys Acta**, v.1771, n.8, p.1031-45, 2007.

HERMAN, J. P. Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Responses to Stressors by the Nucleus of the Solitary Tract/Dorsal Vagal Complex. **Cell Mol Neurobiol**, v.38, n.1, p.25-35, 2018.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci**, v.20, n.2, p.78-84, 1997.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol.**, v. 26, p.277-285, 1989.

HO, D. H. et al. Early life stress in male mice induces superoxide production and endothelial dysfunction in adulthood. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** , v.310, n.9, H1267-74, 2016.

HOLMES *et al.* Galanin GAL-R1 Receptor Null Mutant Mice Display Increased Anxiety-Like Behavior Specific to the Elevated Plus-Maze. **Neuropsychopharmacology**, v.28, p.1031–1044, 2003.

HOLSBOER F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology**, v.23, p.477-501, 2000.

HOLSBOER, F.; ISING, M. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. **Annual Review of Psychology**, v. 61, p. 81–109, C1-11, 2010.

HOUSEKNECHT, K. L.; COLE, B. M, STEELE, P. J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and its ligands: a review. **Domest Anim Endocrinol.** v.22, n.1, p.1-23, 2002.

HUETHER, G. *et al.* The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Research**, v.87, n.1, p.83-95, 1999.

IBARGUEN-VARGAS, I. et al. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. **Psychoneuro endocrinology**, v.33, n.10, p.1357-1368, 2008.

IJAZ, S. et al. Psychological therapies for treatment-resistant depression in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 2018, Issue 5. Art. No.: CD010558

INDA, C. et al. Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. **Endocr Connect**, v.6, n.6, R.99-120, 2017.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocr Rev**, v.12, p. 18- 134, 1991.

JESULOLA, E., MICALOS, P., BAGULEY, I.J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v.341, n.2, p.79-90, 2018.

JIN, S. et al. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life: **NeuroReport**, p. 1, 2018.

JOSELYN, S. A.; NGUYEN, P. V. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. **Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord**, v.4, p.481–497, 2005.

JOYNT, K.E.; WHELLAN, D.J.; O'CONNOR, C.M. Depression and cardiovascular disease: mechanisms of interaction. **Biol Psychiatry**, v.54, n.3, p.248-261, 2003.

Juan, A. et al. Antidepressants and pain. **TRENDS in Pharmacological Sciences** v..27, n.7, 2006.

JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy Behav.** v.38, p.148-59, 2014.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. [The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Rev Bras Psiquiatr**, v.26, n.3, p.189-201, 2004.

KAMADA, H. et al. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats. **J. Cerebral Blood Flow Metabolism**, v.27, p.521-533, 2007.

KANES, S. J. et al. Rolipram: a specific phosphodiesterase 4 inhibitor with potential antipsychotic activity. **Neuroscience**, v.144, n.1, p.239–46, 2007.

KANG, J. et al. Bioactivities Of Açai (Euterpe Precatoria Mart.) Fruit Pulp , Superior Antioxidant And Anti-Inflammatory Properties To Euterpe Oleracea Mart. **Food Chemistry**. v. 133, p. 671–77, 2012.

KAO, C.F. et al. Gene-based analysis of genes related to neurotrophic pathway suggests association of BDNF and VEGFA with antidepressant treatment-response in depressed patients. **Sci Rep**, v.8, n.1; p.6983, 2018.

KAPADIA, R.; YI, J. H.; VEMUGANTI, R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. **Front Biosci**, v.13, p1813-1826, 2008.

KAREGE, F. et al. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Mol. Brain Res**, v.136, p.29-37, 2005.

KIM, M. M.; KIM, S. K. Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. **Food Chem Toxicol**, v.48, n.10, p.2925–2933, 2010.

KOHEN R, NYSKA A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v.30, n.6, p.620-50, 2002.

KOLLA, N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J.S.; LI, X.M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. **J Psychiatry Neurosci.**, v.30, n.3, p.196-201, 2005.

KOOB, G. F. *et al.* The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. **Ciba Found Symp**, v.172, p.277-289, 1993.

KORTE, S. M.; BOUWS, G. A.; BOHUS, B. Central actions of corticotropin-releasing hormone (CRH) on behavioral, neuroendocrine, and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement. **Horm Behav**, v.27, n.2, p.167-83, 1993.

- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v.455, p.894–902, 2008.
- KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat Med**, v.3, p.614–620, 1997.
- KVETNANSKY, R. et al. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. **Adv. Pharmacol.** (San Diego, Calif.), v.68, p.359–397, 2013.
- Lan, N. S. H. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. **Diseases**, v.6, n.2, 2018.
- LEE, B. H.; Kim, Y. K. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. **Psychiatry Investigation**, vol. 7, no. 4, pp. 231–235, 2010.
- LEHMANN, J. et al. Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 457–466, 2002.
- LEHMANN, J.; FELDON, J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? **Rev Neurosci.**, v.11, n.4, p.383-408, 2000.
- LESGARDS, J. F. et al. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. **Chem Biol Interact**, v.190, n.1, p.28–34, 2011.
- LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v.329, p.959-964.
- LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v.329, p.959-964, 2010.
- LINDE, K. et al. “Efficacy and Acceptability of Pharmacological Treatments for Depressive Disorders in Primary Care: Systematic Review and Network Meta-Analysis.” **Annals of Family Medicine**, v.3, n.1, p.69–79, 2015.
- LINDE, K.; SCHUMANN, I.; MEISSNER, K.; JAMIL, S.; KRISTON, L.; RUCKER, G.; ANTES, G.; SCHNEIDER, A. Treatment of depressive disorders in primary care protocol of a multiple treatment systematic review of randomized controlled trials. **BMC Fam Pract**, v.15, p.12-127, 2011.
- LIU, D., XIE, K., YANG, X., GU, J., GE, L., WANG, X., AND WANG, Z. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 264, p. 9–16, 2014.
- LIU, Y., JIA, G., GOU, L., SUN, L., FU, X., LAN, N., LI, S., AND YIN, X. ANTIDEPRESSANT-like effects of tea polyphenols on mouse model of chronic unpredictable mild stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 104, p. 27–32, 2013.

LOPEZ-DURAN, N. L.; KOVACS, M.; GEORGE, C. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: a meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v.34, n.9, p.1272-1283, 2009.

LOUKIDES, S.; BAKAKOS, P.; KOSTIKAS, K. Oxidative stress in patients with COPD. **Curr Drug Targets**, v.12, n.4, p.469-477, 2011.

LSACKSON, P. I. et al. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGE. **Neuron**, v.6, p.937-948, 1991.

LYONS, W. E. et al. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.15239–15244, 1999.

MACHADO, A. K. et al. Upstream pathways controlling mitochondrial function in major psychosis: a focus on bipolar disorder. **Canadian Journal of Psychiatry**. v. 61, n.8, p.446-56, 2016.

MACRÌ, S.; CHIAROTTI, F.; WÜRBEL, H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. **Behav Brain Res**, vol. 191, n. 2, p.227-34, 2008.

MALIN, D. H. et al. Short-term blueberry-enriched diet prevents and reverses object recognition memory loss in aging rats. **Nutrition**, v.27, n.3, p.338–42, 2011.

MAMOUNAS, L. A. et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. **J Neurosci**, v.15, p.7929–7939, 1995.

MANJI, H. K.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med**, v.7, n.5, p. 541–547, 2001.

MARIN, H.; MENZA, M. A. The management of fatigue in depressed patients. **Essent Psychopharmacol**, v.6, p.185–192, 2005.

MARSHALL, J. *et al.* Antidepressant action of BDNF requires and is mimicked by Gai1/3 expression in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.115, n.15, 2018.

MARTÍNEZ-GRAS, I. et al. The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 and its nuclear receptor PPAR γ are decreased in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v.128, p.15–22, 2011.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n.1, 2012, p.164-170, 2012.

MATHEUS, M. E. et al. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 291–296, 2006.

MCGONIGLE, P. Animal models of CNS disorders. **Biochem Pharmacol**, v.87, p.140-149, 2014.

MEDINA, A. E. Therapeutic Utility of Phosphodiesterase Type I Inhibitors in Neurological Conditions. **Front Neurosci**, v.5, p.21, 2011.

MELLO, M. F. et al. Maus-tratos na infância e psicopatologia no adulto: caminhos para a disfunção do eixo hipotálamo-pituitáriaadrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.31, s.2, p.41-48, 2009.

MELO, C.T. et al. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull.**, v.29, n.3. p.451-454, 2006.

MELO, C.T. et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol.**, v.27,n.1, p.104-12, 2013.

Mezadri, T.J. et al. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v.195, n. 2, p. 200-205, 2011.

MONROE, S. M.; SIMONS, A. D. Diathesis-stress theories in the context of life stress research: implications for the depressive disorders. **Psychol Bull**, v.110, n.3, p.406-425, 1991.

MONTEZANO, A. C. et al. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. **Can J Cardiol**, v.31, p.631–641, 2015.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.110, n.1, p.87-94, 2012.

Moraes, A. L.: **Consumo de antidepressivos cresce 74% em seis anos no Brasil.** < <https://saude.abril.com.br/mente-saudavel/consumo-de-antidepressivos-cresce-74-em-seis-anos-no-brasil/>>. Acesso em: 24/05/2018.

MORET C, BRILEY M. The importance of norepinephrine in depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.7, s.1, p. 9–13, 2011.

MOSLEY, R.L. et al. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clin Neurosci Res**, v.6, n.5, p.261-281, 2006.

MUELLER, E. M.; HOFMANN, S. G.; CHERRY, J. A. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram disturbs expression and extinction of conditioned fear in mice. **Neuropharmacology**, v.59, n.1–2, p.1–8, 2010.

MUNEOKA, K. et al. Periodic maternal deprivation induced potentiation of the negative feedback sensitivity to glucocorticoids to inhibit stress-induced adrenocortical response persists throughout the animal's life span. **Neuroscience Letters**, v.168, p.89–92, 1994.

MUÑIZ-MIRET, N. et al. The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the floodplains of the Amazon estuary. Pará, Brazil. **Forest Ecology Management**. v. 87, p. 163-173, 1996.

MUÑIZ-MIRET, N. et al. The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the floodplains of the Amazon estuary. Pará, Brazil. **Forest Ecology Management**. v. 87, p. 163-173, 1996.

MYEKU, N. et al. Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. **Nat Med**, v.22, n.1, p.46–53, 2016.

NEMEROFF, C.B. Neurobiological consequences of childhood trauma. **J. Clin. Psychiatry**, v. 65, s. 1, p.18–28, 2004.

NEMEROFF, C.B. Recent findings in the pathophysiology of depression. **Focus**, v.6, n. 1, p. 3-14, 2008.

NEMEROFF, C.B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol. Psychiatry**, v.1, p.336, 1996.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neuroscience**, v.5, p.1068–1070, 2002.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. **The Journal of Neuroscience**, v.75, n.11, p.7539-7547, 1995.

Nikisch G, Mathe AA, Czernik A, Thiele J, Bohner J, Eap CB, et al. Long-term citalopram administration reduces responsiveness of HPA axis in patients with major depression: relationship with S-citalopram concentrations in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) and clinical response. **Psychopharmacology (Berl)**, p.181, p.751–60, 2005.

O'DONNELL, J. M.; SHELTON, R. C. Tratamento farmacológico depressão e dos distúrbios de ansiedade. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (organizadores). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12^a ed., McGraw Hill, p. 397 - 414, 2012.

O'DONNELL, J. M.; ZHANG, H.T. Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). **Trends Pharmacol Sci**, v.25, n.3, p.158–163, 2004.

ODAKA, H.; ADACHI, N.; NUMAKAWA, T. Impact of glucocorticoid on neurogenesis. **Neural Regen Res**, v.12, n.7, p.1028-1035, 2017.

ODENDAAL AY, SCHAUSS AG. Potent antioxidant and anti-inflammatory flavonoids in the nutrient-rich Amazonian palm fruit, açai (Euterpe spp.). Chapter 18: oxidation and antioxidant activity of polyphenols. In: Watson RR, Reedy VR, Zibadi S, (eds.) Polyphenols in human health and disease. San Diego, CA: **Academic Press**; 2014. p. 219–39.

OKAMOTO, M. et al. Hormetic effects by exercise on hippocampal neurogenesis with glucocorticoid signaling. **Brain Plast.** v.1, n.1, p.149-158, 2015.

OLIVEIRA, P.J.M.; GILBERT, B. Reconhecimento das Plantas Medicinais de uso tradicional no Brasil: A relevância e o pioneirismo da Casa Granada. **Revista Fitos**, v. 9, n. 4, p. 253 - 303, 2015.

OMAR M.E. et al. The effect of different antidepressant drugs on oxidative stress after lipopolysaccharide administration in mice. **EXCLI Journal**, v.10, p.290-302, 2011.

OMS (Organização Mundial da Saúde). The ICD-10 Classification of Mental and Behavioral Disorders – Clinical description and diagnostic guidelines. **World Health Organization**, Genebra, 1992.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2016.

OMS (Organização Mundial da Saúde). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2016.

OMS (Organização Mundial da Saúde). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2017.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2002.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2013.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2015.

OMS (Organização Mundial da Saúde). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2013.

OMS (Organização Mundial da Saúde). The World Health Report - Mental Health: New Understanding, **New Hope**, 2015.

OVERSTREET, D.H.; ELFVING, B. Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v.13, n.4, p.461-473, 2009.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **Br Med Bull**, v.101, p. 127-145, 2012.

PALL, M.L. Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO-cycle. **Med. Hypotheses**, v.69, p.821–825, 2007.

PALTA, P. et al. Depression and Oxidative Stress: Results From a Meta-Analysis of Observational Studies. **Psychosom Med**, v.76, n.1, p.12–19, 2014.

Pan, Y. et al. Icariin attenuates chronic mild stress-induced dysregulation of the LHPA stress circuit in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v.35, p.272–83, 2010.

PARIANTE, C. M.; LIGHTMAN, S.L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**, v.31, n.9), p.464-468, 2008.

PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biol Psychiatry**, v.49, n.5, p.391-404, 2001.

PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. **Curr Opin Neurobiol**, v.11, p.272–280, 2001.

PATEL, D. S.; ANAND, I. S., BHATT, P. A. Evaluation of antidepressant and anxiolytic activity of phosphodiesterase 3 inhibitor-cilostazol. **Indian J Psychol Med**, v.34, p.124-128, 2002.

PATHAK, et al. Natural polyphenols in the management of major depression. **Investigational Drugs**, v.22, n.7, p.863-880, 2013.

PAYKE, E. S. Depression: major problem for public health. **Epidemiol Psichiatr Soc**, v.15, n.1, p.4-10, 2006.

PERITO, M. E. S.; FORTUNATO, J. J. Marcadores Biológicos da Depressão: uma revisão sobre a expressão de fatores neurotróficos. **Revista Neurociências**, v.20, n.4, p.597-603, 2012.

PESSOA, J. D. C.; da SILVA E; SILVA, P. V. Effect of temperature and storage on açai (*Euterpe oleracea*) fruit water uptake. Stimulation of fruit transportation and preprocessing. **Fruits**. v. 62, p. 295-301, 2007.

PHILLIPS, C. Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. **Neural Plasticity**, v.2017, p.1-17, 2017.

PINTCHOVSKI, S. A. The serum response factor and a putative novel transcription factor regulate expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 in neurons. **J. Neurosci**. v.29, p.1525–1537, 2009.

PINTO, V.L.M. et al. Depression and cardiovascular disease: role of nitric oxid. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**, v. 6, n. 2, p. 142-149, 2008.

POMPILI, M. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonin abnormalities: a selective overview for the implications of suicide prevention. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v.260, n.8, p.583-600, 2010.

Porsolt, R. D., LePichon, M., Jalfre, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, v.266, p.730-732., 1977.

POST, R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psych**, v.149, n.8, p.999-1010, 1992.

POULOSE, S. M. *et al.* Restoration of stressor-induced calcium dysregulation and autophagy inhibition by polyphenol-rich açai (*Euterpe spp.*) fruit pulp extracts in rodent brain cells in vitro. **Nutrition** 30(7–8): p. 853–62, 2014.

POZO-INSFRAN D.D, BRENES C.H, E TALCOTT S.T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J Agric Food Chem**. 52: p. 1539-1545, 2004.

QI, G. *et al.* Neuroprotective action of tea polyphenols on oxidative stress-induced apoptosis through the activation of the TrkB/CREB/BDNF pathway and Keap1/Nrf2 signaling pathway in SH-SY5Y cells and mice brain. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4421–4432, 2017.

RAISON, C. L.; CAPURON, L.; MILLER, A. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol**, v.27, p.24-31, 2006.

RANG, H.P. *et al.* Farmacologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.

RAZAVI, D. *et al.* The effect of fluoxetine on anxiety and depression symptoms in cancer patients. Randomized controlled trial. **Acta Psychiatr Scand**, v.94, n.3, p.205-10, 1996.

REDROBE, J. P. *et al.* In vitro and in vivo characterisation of Lu AF64280, a novel, brain penetrant phosphodiesterase (PDE) 2A inhibitor: Potential relevance to cognitive deficits in schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)**, v.231, p.3151-67, 2014.

RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **Biological Psychiatry**, v.46, n. 9, p.1219 – 1233. 1999.

RÉUS, G. Z. *et al.* Maternal deprivation induces depressive-like behavior and alters neurotrophin levels in the rat brain. **Neurochem Res**, v.36, n.3, p.460-6, 2011.

RHEES, R. W.; LEPHART, E. D.; ELIASON, D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. **Behav Brain Res**, v.123, p.1-10, 2001.

RICHARD, R.S.; WANG, L.; JELINEK, H. Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome. **Arch. Med. Res.**, v.38, p.94-98, 2007.

RICHARD, R.S.; WANG, L.; JELINEK, H. Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome. **Arch. Med. Res.**, v.38, p.94-98, 2007.

RICHELSON, E. Pharmacology of antidepressants. **Mayo Clin Proc**, v.76, n.5, p.511-27, 2001.

RIZZUTO, A. Deprivation and Delinquency: By D. W. Winnicott, edited by Clare Winnicott, Ray Shepherd, and Madeleine Davis. London: Tavistock, 1984, VIII + 294 pp. **J. Amer. Psychoanal. Assn.**, v. 38, p. 811-815, 1990.

ROCHA A.P.M, CARVALHO L.C.R.M, SOUSA M.V.A, ET AL. Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascul Pharmacol.** 46: p. 97-104, 2007.

RODRIGUES, R. B. et al. Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4162–4167, 2006.

RODRÍGUEZ-LANDA, J. F. et al. The Aqueous Crude Extracts of *Montanoa frutescens* and *Montanoa grandiflora* Reduce Immobility Faster Than Fluoxetine Through GABA_A Receptors in Rats Forced to Swim. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v.23, publicado online 14/03/2014.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1st ed. **Boca Raton**, CRC Press, P.151-70, 1991.

SACCHET, C. et al. Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2015, p601503, 2015.

SAKAKIBARA, H.etal. Antidepressant effects of extracts from Ginko biloba leaves in behavioral models. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p. 1767 - 1770, 2006.

SANDERS, P.; KORF, J. Neuroaetiology of chronic fatigue syndrome: an overview. **World J. Biol. Psychiatry**, v.8, p.1-7, 2007.

SANDSTROM, J. et al. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. **J Biol Chem**, v.269, n.29, p.19163-6, 1994.

SANTOS, M. F.; MAMEDE, R. V.; RUFINO, M. S.; de BRITO, E. S.; ALVES, R. E. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. **Antioxidants**. v. 4, p. 591-602, 2015.

SARKO, J. ANTIDEPRESSANTS, OLD AND NEW: A Review of Their Adverse Effects and Toxicity in Overdose. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v.18, n.4, p.637-654, 2000.

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. 15d-PGJ 2: The anti-inflammatory prostaglandin? **Clin. Immunol.**, v.114, p.100-109, 2005.

SCHIAVONE, S; COLAIANNA, M; CURTIS, L. Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders: relation to brain oxidative stress. **Curr Pharm** p.1404–1412, 2015.

SEROVA, L. Altered gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and stress response in rat genetic model of depression. **Molecular Brain Research**, v.63, p.133–138, 1998.

SEROVA, L. et al. Immobilization stress elevates GTP cyclohydrolase I mRNA levels in rat adrenals predominantly by hormonally mediated mechanisms. **Stress**, v.1, p. 135–144, 1997.

SERULLE, Y. et al. A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking. **Neuron**, v.56, p.670–688, 2007.

SHARPLEY, C. F.; AGNEW, L. L. Cytokines and depression: Findings, issues, and treatment implications. **Rev Neurosci**, v.22, p.295-302, 2011.

SHARPLEY, C. F.; BITSIKA, V. Joining the dots: neurobiological links in a functional analysis of depression. **Behav Brain Funct**, v.6, n.73, p.1-9, 2010.

SHER, L. et al. Combined dexamethasone suppression-corticotrophin releasing hormone stimulation test in medication-free major depression and healthy volunteers. **J Affect Disord**, v.151, n.3, p.1108-1112, 2013.

SHIM, Y. S. et al. Effects of daily low-dose treatment with phosphodiesterase type 5 inhibitor on cognition, depression, somatization and erectile function in patients with erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. **International Journal of Impotence Research**, v.26, p.76–80, 2013.

SHORS, T. J., PICKETT, J., WOOD, G., AND PACZYNSKI, M. Acute stress persistently enhances estrogen levels in the female rat. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 3, n. 2, p. 163–171, 1999.

SHUKITT-HALE B. et al. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. **Nutrition**, v. 22, n. 3, p. 295–302, 2006.

SHUKITT-HALE B., CHENG V., E JOSEPH J.A. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. **Nutr Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 135–40, 2009.

SILVA, A. J. CREB and memory. **Annu. Rev. Neurosci**, v.21, p.127–148, 1998.

SILVA, H. Socio-ecology of health and disease: the effects of invisibility on the caboclo populations of the Amazon. In: Amazon Peasant Societies in a Changing Environment (Adams C, Murrieta R, Neves W, Harris M, eds.). Springer, **Dordrecht, the Netherlands**, v. 2008, p. 307–333, 2008.

SINGH, A.; KAR, S. K. How Electroconvulsive Therapy Works?: Understanding the Neurobiological Mechanisms. **Clin Psychopharmacol Neurosci**, v.15, n.3, p.210-221, 2017.

SIUCIAK, J. A. et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) produces an anti-depressant like effect in two animal models of depression. **Sot Neurosci Abstr**, v.20, p.1-106, 1994.

SMITH, M. A. et al. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **J Neurosci**, v.15, p.1768–1777, 1995.

SOARES DE MOURA R., DA COSTA G.F., MOREIRA A.S. *Vitis vinifera* L. grape skin extract activates the insulin-signalling cascade and reduces hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic mice. **J Pharm Pharmacol**. [s. l], v. 64: p. 268-276, 2012.

SONAWALLA, S. B. et al. Fluoxetine treatment of depressed patients with comorbid anxiety disorders. **J Psychopharmacol**. v.16, n.3, p.215-9, 2002.

SOUZA-MONTEIRO, J. R. et al. Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. **Neurochemiatry International**. v. 90, p. 20-27, 2015.

SPASOJEVIC, N.; JOVANOVIC, P.; DRONJAK, N. Differential regulation of catecholamine synthesis and transport in rat adrenal medulla by fluoxetine treatment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n.1.2015.

STAHL, S. M. Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. 3 ed. New York, NY: **Cambridge University Press**; 2008.

STARKMAN, M. N.; GEBARSKI, S. S.; BERENT, S.; SCHTEINGART, D. E. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. **Biol Psychiatry**, v.32, n.9, p.756-765, 1992.

STEIN-BEHRENS, B. Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. **J Neurosci**, v.14, p.5373-5380, 1994.

STRUDWICK, J.; SOBEL, G. I. Uses of *Euterpe oleracea* Mart in the Amazon Estuary, Brazil. **Advances in Economic Botany**. v.6, p. 225-253, 1988.

SUBHANI, A. R. et al. Mitigation of stress: new treatment alternatives. **Cogn Neurodyn**, v.12,n.1, p.1-20,2018.

SUDHEIMER, K. D. et al. Exogenous glucocorticoids decrease subgenual cingulate activity evoked by sadness. **Neuropsychopharmacology**, v.38, p.826–845, 2013.

SUDHEIMER, K. et al. Decreased Hypothalamic Functional Connectivity with Subgenual Cortex in Psychotic Major Depression. **Neuropsychopharmacology**, v.40, n.4, p.849–860, 2015.

SUDO, R.T.; LEMOS NETO, M.; TAKASHI, R.; e cols. Antinoceptive effects of hidroalcoholic extrac (ASE) from Euterpe oleracea Mart. (Açaí) rodent models of acute an neurophatic pain. **BMC Complement Altern. Med**, v.2, n.15, p. 208, 2015.

SUN, E. *et al.* The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. **Biol Trace Elem Res**, v.48, n.3, p.231-8, 1995.

TITUS, D. J. et al. Phosphodiesterase inhibition rescues chronic cognitive deficits induced by traumatic brain injury. **J Neurosci**, v.33, n.12, p.5216–526, 2013.

TIWARI, A.. Biological alterations affecting risk of adult psychopathology following childhood trauma: A review of sex differences. **Clinical Psychology Review** (2018),

TORRES, J.M.; CHAVEZ, A.G. Secamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y perspective**, v. 20, p. 377-387, 2001.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v.44, n.3, p.248-52, 2004.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res**, v.34, p.5–14, 2011.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol**, v.122, n.4, p.339-52, 2004.

UNO, H. et al. Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. **J Neurosci**, v.9, p.1705-1711, 1989.

VALDÉS-SUSTAITA, B. et al. Aqueous Extract of Pomegranate Alone or in Combination with Citalopram Produces Antidepressant-Like Effects in an Animal Model of Menopause: Participation of Estrogen Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n.12, p.2643.

VALENTINO, R. J.; FOOTE, S. L.; ASTON-JONES, G. Corticotropinreleasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. **Brain Res**, v.270, n.2, p.363-367, 1983.

VAN AMSTERDAM, J. G.; OPPERHUIZEN, A. Nitric oxide and biopterin in depression and stress. **Psychiatry Res**, v.85, n.1, p.33-38, 1999.

VAN DER KRAAIJ et al. Iron-load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. Protection by the antioxidant (+)-cyanidanol-3 and deferoxamine. **Circulation**, v.78, n.442-449, 1988.

VAN ROSSUM, E.F.C.; VAN DEN AKKER, E.L.T. Glucocorticoid Resistance. **Endocr Dev**. Basel, Karger, v. 20, p.127–136, 2011.

VASANTMEGHNA, S. M.; MANGOT, A. G. Psychiatric aspects of phosphodiesterases: An overview. **Indian Journal of pharmacology. EDUCATIONAL FORUM**, v.47, n.6, p.594-599, 2015.

VIRDIS, A. et al. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. **J Hypertens**, v.22, p.535-542, 2004.

WACHTEL-GALOR, S.; BENZIE, I. F. F. Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. Editors In: BENZIE, IFF, WACHTEL-GALOR, S., editors. *Source Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. **Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis**; 2011. Chapter 1.

WAKU, T. et al. The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin-and fatty acid-metabolites. **EMBO J**, v.29, p.3395-3407, 2010.

WANG, *et al.* Antioxidant activity of Tartary buckwheat bran extract and its effect on the lipid profile of hyperlipidemic rats. **J Agric Food Chem**, v. 57, n.11, p.5106-12, 2009.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Res**, v.588, p.341-345, 1992.

WEGENER, G. et al. BDNF/TrkB Pathway Mediates the Antidepressant-Like Role of H2S in CUMS-Exposed Rats by Inhibition of Hippocampal ER Stress. **NeuroMolecular Medicine**, v. 20, n. 2, p. 252–261, 2018.

WILLIAM TANK; DONA LEE WONG. Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines. **Comprehensive Physiology**, v.5, jan 2015.

WILLNER, P. Validating criteria for animal models of human mental disorders: Learned helplessness as a paradigm case. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 10, p. 677- 690, 1986.

WILLNER, P; MITCHELL, P.J. Animal models of depression: a diathesis/stress approach. In: D'haenen, H.; Den Boer, J; Willner, P. (Eds.), **Biological Psychiatry**. Wiley, New York, pp. 703-726. 2002.

WINNICOTT, D.W. Disorders of childhood. **J R Inst Public Health**, v.11, n.7, p.244, 1948.

WINNICOTT, D.W. *et al.* (1984): Introdução às quatro partes de Winnicott. In: *Privação e Delinquência*, São Paulo: **Martins Fontes**, 1987.

WINNICOTT, D.W. The theory of the parent-infant relationship. **Int J Psychoanal**, v. 41, p. 585-95, 1960.

WONG, D. Y. S.; MUSGRA, V. E. I. F.; HARVEY, B. S.; SMID, S. D. Açai (*Euterpe oleracea Mart.*) berry extract exerts neuroprotective effects against β -amyloid exposure in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 221-226, 2013.

WORKEL, J. O. Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence. **J Neuroendocrinol**, v.13, n.7, p.569-80,2001.

WURGLICS, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.. Hypericum Perforatum: A 'Modern' Herbal Antidepressant. **Clinical Pharmacokinetics**, v.45, n.5, p.449, 2006.

XU, Y. et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. **Brain Res**, v.1162, p.9-18, 2007.

YAGER, S.; FORLENZA, M.J.; MILLER, G.E. Depression and oxidative damage to lipids. **Psychoneuroendocrinology**, v.35, n.9, p.1356-1362, 2010.

YANG J. et al. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.111, p.12228–12233, 2014.

YILDIZ, F.; ERDEN, B.F.; ULAK, G.; UTKAN, Y.; GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, v.149, p.41-44, 2000.

YOUNG, E. A. Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. **Arch Gen Psychiatry**, v.48, p.693-699, 1991.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. **Prog europsihopharmacol Biol Psychiatry.**, v.33(2), p.220-228, 2009.

ZAGREBELSKY, M. The p75 Neurotrophin Receptor Negatively Modulates Dendrite Complexity and Spine Density in Hippocampal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 43, p. 9989–9999, 2005.

ZENI, B.A. L. et al. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.1, p.864-874, 2011.

ZHU, W.-L. et al. Green tea polyphenols produce antidepressant-like effects in adult mice. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 1, p. 74–80, 2012.