

Suene Vanessa da Silva Souza

**EFEITOS DO COLECALCIFEROL NOS PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE
DEPRESSÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA
DE CORTICOSTERONA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do Grau de
Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Júlia Dubois
Moreira

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Suene Vanessa da Silva

Efeitos do colecalciferol nos parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em camundongos submetidos a um modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona / Suene Vanessa da Silva Souza ; orientadora, Júlia Dubois Moreira, 2018.

66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Nutrição. 3. Colecalciferol. 4. Depressão. 5. Estresse oxidativo. I. Moreira, Júlia Dubois. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Suene Vanessa da Silva Souza

**EFEITOS DO COLECALCIFEROL NOS PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE
DEPRESSÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA
DE CORTICOSTERONA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Nutrição e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN/UFSC)

Florianópolis, 30 de Julho de 2018.

Prof. Patrícia Faria Di Pietro, Dr.^a
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição
(PPGN/UFSC)

Banca Examinadora:

Prof.^a Júlia Dubois Moreira, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Vivian Binder Neis, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Debora Kurrle Rieger Venske, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luciana C. Antunes, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à todos que me apoiaram, especialmente à minha família.

AGRADECIMENTOS

Escrever esse agradecimento é perceber o melhor resultado desse trabalho. É concluir, que esses dois anos não resultaram em apenas dados científicos e sim em amizades, apoios e parcerias.

Primeiro, quero agradecer à minha família, pai, mãe e meu irmão, que foram os primeiros a me apoiarem, mesmo sabendo que a saudade ia ser grande devido à distância. Vocês foram fundamentais para eu chegar até aqui, pois sempre estavam presentes, seja por telefone, chamadas de vídeos, mensagens e visitas quando podiam.

Agradeço às amigas de Florianópolis em especial a Michele, que esteve comigo desde o processo seletivo e as amigas Thais, Cinthia, Angela, Júlia Buzzi e Julia Basso, obrigada pelas conversas, incentivos, abraços, companhias, e a amizade de vocês.

Agradeço àquelas amigas que mesmo de longe me apoiaram, em especial a Elisvânia, que foi a primeira a me incentivar a seguir a carreira acadêmica, como minha orientadora na graduação. E às minhas melhores amigas Giovanna, Mariana e Yara que sempre me deram força durante esse tempo.

À professora Júlia que sem dúvidas foi e está sendo essencial nessas orientações finais. À Morgana, que me acolheu de braços abertos para inicialmente me orientar, mesmo eu estando perdida no início, teve toda a paciência para me ensinar e me ajudar com esse trabalho. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e apoio de cada uma.

Ao pessoal do grupo de pesquisa do laboratório de Neurobiologia da Depressão do departamento de bioquímica do CCB, em especial a Priscila e a Vivian, que foram fundamentais para execução desse projeto.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior(CAPES) pela bolsa de estudos durante os dois anos de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

“Às vezes precisamos abandonar a vida que havíamos planejado, porque não somos mais a mesma pessoa que fez aquele plano” (Autor desconhecido).

RESUMO

O transtorno depressivo maior (ou depressão) é uma das doenças psiquiátricas mais frequentes na população, tendo o estresse crônico como um dos principais fatores etiológicos. Alguns estudos clínicos têm demonstrado que a suplementação da vitamina D pode levar a atenuação do estado depressivo. Porém, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos nessa relação entre a vitamina D e a depressão. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da administração crônica de 100 UI/kg/dia de colecalciferol em parâmetros comportamentais [teste de suspensão pela cauda (TSC), teste do campo aberto (TCA) e teste de borrifagem de sacarose (TBS)] e de estado redox [diclorofluoresceína (DCF)], em camundongos submetidos a um modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona, o principal hormônio do estresse em animais. Para realização desse estudo, foram utilizados camundongos adultos Swiss fêmeas. Para indução do comportamento tipo-depressivo, a corticosterona (20 mg/kg) foi administrada uma vez ao dia, durante 21 dias. Para a investigação do efeito tipo-antidepressivo, o colecalciferol (100 UI/kg) ou a fluoxetina (10 mg/kg, controle positivo) foram administrados nos últimos 7 dias da administração de corticosterona. Após os tratamentos, foram realizados os testes comportamentais e análises bioquímicas em amostras de hipocampo e córtex pré-frontal dos roedores. Os animais submetidos às doses repetidas de corticosterona apresentaram um comportamento do tipo-depressivo, evidenciado pelo aumento significativo do tempo de imobilidade no TSC, o qual foi reduzido significativamente com a administração de colecalciferol ou fluoxetina. Além disso, os grupos tratados com colecalciferol ou fluoxetina apresentaram menor porcentagem da unidade arbitrária de fluorescência de DCF, indicando menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no hipocampo. Estes resultados mostraram que o colecalciferol, similar à fluoxetina, tem um potencial efeito tipo-antidepressivo, o qual pode estar relacionado à menor produção de EROS no hipocampo.

Palavras-chave: Colecalciferol. Depressão. Corticosterona. EROS; Hipocampo. Estado redox.

ABSTRACT

Major depressive disorder (or depression) is one of the most frequent psychiatric illnesses in the population, with chronic stress being one of the main etiological factors. Some clinical studies have shown that vitamin D supplementation can lead to attenuation of the depressive state. However, the biochemical mechanisms involved in the relationship between vitamin D and depression are not very well known. The objective of this study was to investigate the effects of administration of cholecalciferol (vitamin D3) 100 IU/kg/day on behavioral parameters [tail suspension test (TST), open field test (OFT), splash test (ST)] and redox state [dichlorofluorescein (DCF)] in mice undergoing a model of depression induced by chronic corticosterone treatment, the main stress hormone in animals. For this study, adult female Swiss mice were used. To induce depressive-like behavior, corticosterone (20 mg/kg) was administered once a day for 21 days. For investigation of the antidepressant-like effect, cholecalciferol (100 IU/kg) or fluoxetine (10 mg/kg, positive control) were administered within the last 7 days of corticosterone administration. After the treatments, the behavioral tests and biochemical analysis in the hippocampus and prefrontal cortex of the rodent samples were performed. Animals submitted to repeated corticosterone administration showed a depressive-like behavior, evidenced by a significant increase in the immobility time in the TST, which was significantly reduced by the administration of cholecalciferol or fluoxetine. In addition, the groups treated with cholecalciferol and fluoxetine showed lower percentage of the arbitrary dichlorofluorescein (DCFH) fluorescence unit, indicating lower production of reactive oxygen species (ROS) in the hippocampus of the mice. These results showed that cholecalciferol, similar to fluoxetine, has a potential antidepressant-like effect, which may be related to the lower ROS production.

Keywords: : Cholecalciferol. Depression. Corticosterone. ROS. Hippocampus. Redox state.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Metabolismo da Vitamina D.....	24
---	----

MÉTODOS

Figura 2 - Efeito do tratamento (21 dias) com veículo, fluoxetina ou Colecalciferol no TSC (figura 2A) e TCA (figura 2B)	30
Figura 3 - Fluxograma do estudo	31
Figura 4 - Linha temporal do estudo.....	32

RESULTADOS

Figura 1 - Efeito do tratamento (21 dias) com veículo, fluoxetina ou Colecalciferol no TSC (figura 1A) e TCA (figura1B).....	42
Figura 2 - Efeito do tratamento de 7 dias com veículo, fluoxetina ou colecalciferol no tempo de imobilidade no TSC (Fig. 2A) e atividade locomotora no TCA (Fig. 2B) em camundongos submetidos a 21 dias de administração de corticosterona.....	43
Figura 3 - Efeito do tratamento de 7 dias com veículo, fluoxetina ou colecalciferol no tempo de latência (Fig. 3A) e tempo total de autolimpeza (Fig. 3B) no TBS em camundongos submetidos a 21 dias de administração de corticosterona.....	43
Figura 4 - Efeito do tratamento de 7 dias com veículo, fluoxetina ou colecalciferol na produção de espécies reativas de oxigênio (expresso em U. A. de fluorescência) no hipocampo (Fig. 5A) e córtex pré-frontal (Fig. 5B) de camundongos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Associação entre a depressão e marcadores de estresse oxidativo em modelos animais.....	19
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDI - Beck Depression Inventory
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CAT – Catalase
DCF – Diclorofluoresceína
DCFH - 2, 7 diclorofluoresceína
DMSO - Dimetilsulfóxido
ERNS - Espécies reativas de nitrogênio
EROS - Espécies reativas de oxigênio
GR - Glutaciona redutase
GPX - Glutaciona peroxidase
GSH - Glutaciona
HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal
MDA - Malondialdeído
NADPH –Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
SOD – Superóxido dismutase
SNC – Sistema nervoso central
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBS - Teste de borrifagem de sacarose
TCA - Teste do campo aberto
TNF - Teste do nado forçado
TSC - Teste de suspensão pela cauda
VDR - Receptores intracelulares de vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 DEPRESSÃO	16
2. 1. 1 Aspectos gerais.....	16
2. 1. 2 Estresse Oxidativo e depressão.....	17
2. 1. 3 Modelos animais de depressão.....	20
2. 1. 4 Tratamentos.....	21
2. 2 VITAMINA D.....	22
2. 2. 1 Aspectos gerais.....	22
2. 2. 2 Vitamina D e depressão	24
3 OBJETIVOS.....	28
3. 1 OBJETIVO GERAL.....	28
3. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MÉTODOS	29
4. 1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	29
4. 2 ANIMAIS.....	29
4. 3 ESTUDO PILOTO.....	29
4. 4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	30
4. 4. 1 Indução do comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de corticosterona.....	31
4. 4. 2 Investigação do efeito do Colecalciferol no modelo de depressão induzida por corticosterona	31
4. 5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	32
4. 5. 1 Teste da suspensão pela cauda (TSC)	32
4. 5. 2 Teste do campo aberto (TCA)	32
4. 5. 3 Teste de borrifagem de sacarose (TBS).....	33
4. 6 EUTANÁSIA	33
4. 7 MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS DO ESTADO REDOX.....	33
4. 7. 1 Determinação do DCF- DA.....	33
4. 7. 2 Determinação de Proteínas.....	34
4. 8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	34
5 RESULTADOS.....	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO.....	66

1 INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno psiquiátrico que tem como principal característica o humor deprimido e está entre os que mais causam incapacidade no mundo (WHO, 2017a). Atualmente cerca de 300 milhões de indivíduos são diagnosticados com depressão, sendo mulheres e idosos a população mais acometida (WHO, 2017a).

Apesar de sua etiologia não estar totalmente elucidada, sabe-se que a depressão é uma doença multifatorial, e os fatores ambientais como o estresse têm sido considerados um dos seus principais determinantes (SIEGRIST et al., 2012; OTTE et al., 2016). Além disso, diversos mecanismos têm sido implicados na fisiopatologia da depressão, entre eles o processo de estresse oxidativo (LIU et al., 2015; BLACK et al., 2015). Alguns estudos têm evidenciado sinais de danos oxidativos como altas concentração de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica tanto em amostras de urina de pessoas diagnosticadas com depressão quanto nos tecidos do hipocampo e córtex pré-frontal de animais submetidos à modelos experimentais de depressão (HAN et al., 2016; SILVA et al., 2016). Além disso, também são observadas alterações dos parâmetros do estado redox como diminuição da capacidade antioxidante sérica em indivíduos depressivos (Liu et al., 2015) e elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no hipocampo e córtex pré-frontal em camundongos (ZHANG et al., 2016).

Devido à complexidade do processo fisiopatológico das doenças neurológicas, a utilização de estudos experimentais em animais de laboratório se torna essencial, pois estes facilitam a investigação dos processos a nível celular e molecular (OTTE et al., 2016), que ainda não podem ser compreendidos em pesquisas com seres humanos (KANDRATAVICIUS et al., 2014). Logo, uma das maneiras de se investigar a depressão, é através da sua reprodução em roedores. Uma das formas de indução da depressão é a mimetização do estresse crônico pela administração de doses repetidas de corticosterona (ZHAO et al., 2008), o principal hormônio do estresse em roedores, sendo este modelo baseado na desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Joseph e Golden, 2016). Este modelo é considerado um método válido e coerente (ZHAO et al., 2008), pois é observado processos bioquímicos que tem sido implicado na fisiopatologia da depressão, como o processo de estresse oxidativo (LIU et al., 2015; SILVA et al., 2016). Além disso, os roedores submetidos a esse modelo apresentam comportamentos do tipo-depressivo e anedônico, avaliados por testes comportamentais

como teste do nado forçado (TNF), teste de suspensão pela cauda (TSC) e teste de borrifagem de sacarose (TBS) (ZHAO et al., 2008; MORETTI et al., 2012). Ainda, esses testes são considerados teste preditivos utilizados para também avaliar o rastreamento de compostos com propriedades tipo-antidepressivas em animais (MORETTI et al., 2012; ROSA et al., 2014; LIEBERKNECHT et al., 2017).

A principal forma de tratamento da depressão consiste no uso de fármacos antidepressivos, como a Fluoxetina (KHAWAM et al., 2006; WHO, 2017b). No entanto, nem todos os pacientes aderem ao tratamento farmacológico, ou mesmo sentem melhoras significativas com o seu uso (SANSONE E SANSONE, 2012; YAU et al., 2014; ALEKHIA et al., 2015). Entre os principais motivos da não-aderência ao tratamento farmacológico estão os efeitos colaterais como sonolência, disfunção sexual, constipação, ganho de peso, náuseas, vômitos e tontura (KHAWAM et al., 2006; BET ET AL., 2013). Na tentativa de contornar este obstáculo, investigações dos efeitos de tratamentos alternativos e complementares como psicoterapia, exercício físico e terapia nutricional têm sido sugeridos (HALLGREN et al., 2017; MANOSSO et al., 2013). Dados na literatura têm evidenciado efeitos antidepressivos de alimentos como cebola (SAKAKIBARA et al., 2008), alho (DHINGRA; KUMAR., 2008) café (LUCAS et al., 2011; PHAM et al., 2013), além de minerais e vitaminas, como zinco, magnésio, selênio, vitamina C, vitamina B e vitamina E (MANOSSO; MORETTI; RODRIGUES, 2013; BEYER; PAYNE, 2016).

Uma das vitaminas cujos possíveis efeitos antidepressivos vêm sendo investigados é a vitamina D. Além de estudos epidemiológicos evidenciarem que indivíduos diagnosticados com depressão apresentam deficiência desse micronutriente (SHIN et al., 2016; BROUWER-BROLSMA et al., 2016), alguns estudos clínicos têm observado que a sua suplementação pode levar a melhoras no estado depressivo dos pacientes (MOZAFFARI-KHOSRAVI et al., 2013; SEPHRMANESH et al., 2016). Entretanto, estudos de revisão indicam a necessidade de mais pesquisas para melhor entender sobre a função dessa vitamina e seus mecanismos bioquímicos envolvidos na depressão (ANGLIN et al., 2013; PARKER; BROTCHE; GRAHAM, 2017). Nesse contexto, pesquisas experimentais têm mostrado que a vitamina D desempenha importantes funções no sistema nervoso central (SNC), como melhora no declínio cognitivo (ERBAS et al., 2014; ALREFAIE; ALHAYANI, 2015), inibição da apoptose (MPANDZOU et al., 2016), melhora na expressão de neurotransmissores (EYLES; BURNE; MCGRATH, 2013)

e atenuação do estresse oxidativo cerebral (CHEN; LIN; CHIU, 2003; TARBALI; KHEZRI, 2016). Além disso, um estudo em ratas ovariectomizadas, mostrou que o colecalciferol pode apresentar efeitos tipo-ansiolíticos e tipo-antidepressivos nesses animais (FEDOTOVA et al., 2016; FEDOTOVA; PIVINA; SUSHKO, 2017).

Embora algumas evidências apontem para um efeito da vitamina D sobre a depressão, pouco se sabe sobre a função dessa vitamina e seus mecanismos bioquímicos envolvidos na depressão. Isso torna esse trabalho importante, pois pode fornecer bases mais sólidas para a compreensão dos potenciais mecanismos antidepressivos dessa vitamina, bem como contribuir de forma efetiva para avanços no entendimento da fisiopatologia da depressão.

Diante disso, este trabalho apresenta a seguinte pergunta de partida: Quais os efeitos da administração do colecalciferol (vitamina D3) nos parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em camundongos submetidos a um modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona?

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DEPRESSÃO

2.1.1 Aspectos gerais

No O transtorno depressivo maior ou depressão é o mais comum transtorno psiquiátrico que afeta negativamente o modo de agir, pensar e sentir das pessoas, gerando vários problemas emocionais e físicos (APA, 2017). É considerada a principal causa de incapacitação do mundo, podendo levar o indivíduo ao suicídio (OMS, 2017).

Segundo a organização mundial da saúde (2017), cerca de 300 milhões de pessoas sofrem com este transtorno. No Brasil, aproximadamente 5,5 milhões de indivíduos possuem maior risco de ter depressão, sendo mais prevalente em mulheres e idosos (MUNHOZ et al, 2016). Além disso, vale ressaltar que a alta prevalência da depressão tem gerado altos custos (cerca de 1 trilhão a cada ano) à economia global (OMS, 2016a), custos esses que incluem, além de gastos com tratamentos, a perda da produtividade em consequência da incapacidade gerada pela depressão (MIRET et al., 2013).

Uma das principais formas de diagnóstico dessa doença é feita através do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais, elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria. O indivíduo é diagnosticado quando apresentar, por um período mínimo de 2 semanas, cinco ou mais dos seguintes sintomas: humor deprimido; perda de interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades; perda ou ganho de peso sem explicação; insônia ou hipersônia; agitação ou retardo psicomotor; fadiga ou perda de energia; sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva; diminuição da capacidade de concentração, pensar ou indecisão; pensamentos de morte, ideação ou tentativa de suicídio. Vale ressaltar que os dois primeiros sintomas devem estar presentes na maior parte do tempo (APA, 2013).

Sabe-se que a depressão é uma doença multifatorial e que sua origem pode envolver tantos fatores genéticos ou ambientais, quanto suas interações (OTTE et al., 2016). Estudos indicam que os principais fatores ambientais associados ao desenvolvimento do transtorno são os eventos estressantes que afetam a qualidade de vida, alteração nas condições sociais, financeiras, estrutura familiar e estilo de vida, bem como traumas, alimentação inadequada e pouca atividade física (OTTE et al., 2016; XU et al., 2016). Além disso, uma pesquisa transversal e longitudinal mostrou que indivíduos com elevado nível de estresse no

trabalho têm uma alta probabilidade, (variando entre 60% a 120%) de desenvolver sintomas depressivos (SIEGRIST et al., 2012).

Apesar do grande avanço no estudo da neurobiologia da depressão, a etiologia desse transtorno ainda não está completamente elucidada. Existem muitos mecanismos implicados em sua fisiopatologia, como os sistemas neurotransmissores glutamatérgico e monoaminérgico, desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), processos inflamatórios, bem como o processo de estresse oxidativo (NESTLER et al., 2002; BLACK et al., 2015; LIU et al., 2015; OTTE et al., 2016).

2.1.2 Estresse Oxidativo e depressão

O estresse oxidativo é um processo decorrente do desequilíbrio da sinalização e controle redox, no qual, há um aumento de compostos oxidantes em relação aos agentes antioxidantes, causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROS/ERNs) no organismo (JONES, 2006; CIRCU; AW, 2010). Contudo, vale ressaltar que a produção de EROS e ERNs é normal em organismos aeróbicos. Essas espécies reativas podem ser oriundas de processos fisiológicos como o transporte de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial, a sinalização celular, processos de defesas contra patógenos e também pode ser proveniente diretamente da oxidação de compostos químicos estranhos ao organismo (MONICZEWSKI et al., 2015; MAURYA et al., 2016). Entretanto, a produção excessiva de EROS/ERNs ou a diminuição de defesas antioxidantes pode causar danos oxidativos, os quais podem levar a danos no DNA, oxidação de lipídios e proteínas e até a morte celular (CIRCU; AW, 2010; BLACK et al., 2015; MAURYA et al., 2016).

Nesse âmbito, muitos desses danos têm sido utilizados como biomarcadores do estresse oxidativo. Como exemplos, a peroxidação lipídica, determinada pelo aumento dos compostos MDA e F2-isoprostanos, assim como danos oxidativos ao DNA, determinados pelo elevado nível do composto 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) (BLACK et al., 2015; MAURYA et al., 2016). Além disso, biomarcadores do estado redox como os níveis de glutatona (GSH), atividades das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX), catalase (CAT) e produção de EROS têm sido importantes indicadores para observação processo do estresse oxidativo (MAURYA et al., 2016).

O estresse oxidativo tem sido associado com muitas doenças crônicas, principalmente as neurológicas como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, autismo, ansiedade e depressão (SMAGA et al., 2015; MANOHARAN et al., 2016). Um dos fundamentos para essa associação é o fato do tecido nervoso ser muito sensível ao dano oxidativo, devido ao seu elevado teor de lipídios e alta demanda de oxigênio (MONICZEWSKI et al., 2015).

Particularmente relevante para este trabalho, várias pesquisas têm constatado uma relação entre estresse oxidativo e a depressão, indicando que indivíduos depressivos apresentam elevadas concentrações de 8-OHdG e F2-isoprostanos (BLACK et al., 2015; HIROSE et al., 2016). Além disso, um estudo realizado com idosos diagnosticados com depressão através de uma escala de rastreamento de depressão, apontou uma relação entre elevadas concentrações de MDA urinário e um aumento de aproximadamente 30% dos sintomas depressivos (HAN; LIM; HONG, 2016). Ainda, outros estudos apontam que pacientes com depressão têm menor capacidade antioxidante do que indivíduos saudáveis (CHANG et al., 2015; LIU et al., 2015).

A associação entre o estresse oxidativo e a depressão também é bastante evidente em estudos experimentais (Tabela 1). Essas pesquisas têm confirmado que animais que apresentam comportamento do tipo-depressivo exibem elevados níveis de marcadores de danos oxidativos como a carboxilação proteica, 8-isoprostano e MDA, além da redução dos níveis da capacidade antioxidantes, como a GSH, GR e SOD, e aumento da produção de EROS na região hipocampal e no córtex pré-frontal (PATKI et al., 2013; MELLO et al., 2014; SILVA et al., 2016, ZHANG et al., 2016). Ainda nesse contexto, dados na literatura também evidenciam um aumento das atividades das enzimas GR, SOD e GPX em modelos de depressão, possivelmente como um efeito compensatório em razão da produção excessiva de EROS (MORETTI et al., 2013; SILVA et al., 2016).

Tabela 1. Associação entre a depressão e marcadores de estresse oxidativo em modelos animais.

Referência	Animais	Indução do comportamento tipo-depressivo	Parâmetros oxidativos
PATKI et al., 2013	Ratos machos <i>Sprague Dawley</i> e <i>Long-Evans</i>	Estresse induzido por derrota social por 7 dias	Baixos níveis de GR e SOD na região do hipocampo
MORETTI et al., 2013	Camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	Estresse de contenção por 7 horas	Atividade elevada de GR na região do córtex Atividade elevada de SOD e GPX e aumento da lipoperoxidação (TBARS) nas regiões do córtex e hipocampo
MELLO et al., 2014	Ratos <i>Wistar</i> machos	Estresse crônico leve por 40 dias	Altos níveis de carboxilação proteica na região do córtex, hipocampo e estriado Aumento da lipoperoxidação, na região do cerebelo e estriado
SILVA et al., 2016	Camundongos <i>Swiss</i> fêmeas	Indução pela administração de corticosterona por 21 dias	Baixos níveis de GSH na região do hipocampo Aumento da lipoperoxidação (TBARS) na região do córtex, hipocampo e estriado Elevada atividade de SOD na região do córtex e hipocampo
GUPTA; RADHAKRISHNA N; KURHE, 2015	Camundongos <i>Swiss</i> machos	Indução pela administração de corticosterona por 28 dias	Baixos níveis de GSH e aumento da lipoperoxidação e níveis de nitrito no cérebro total.
ZHANG et al., 2016	Camundongos BALB/c machos	Estresse crônico imprevisível leve por 4 semanas	Elevada produção de EROS na região do córtex e do hipocampo

EROS: Espécies reativas de oxigênio; GR: Glutaciona redutase; GPX: Glutaciona peroxidase; GSH: Glutaciona; MDA: Malondialdeído; SOD: Superóxido dismutase; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

2.1.3 Modelos animais de depressão

O complexo mecanismo de doenças neuropsiquiátricas ainda não pode ser completamente entendido pelos estudos em humanos (KANDRATAVICIUS et al, 2014). Logo, o uso de animais de laboratório se torna necessário para pesquisas de transtornos como a depressão. Além disso, seus resultados podem ser importantes para nortear posteriores investigações clínicas (OTTE et al., 2016).

Existem diversas metodologias para a indução de um comportamento tipo-depressivo em animais. Uma delas é através da reprodução do estresse crônico (ZHAO et al., 2008), um dos fatores ambientais sugeridos em sua etiologia (OTTE et al., 2016). Em condições normais, o eixo HPA é ativado em resposta ao estresse, estimulando secreções de hormônios pelo hipotálamo (hormônio liberador de corticotropina) e pela glândula pituitária (hormônio adrenocorticotrófico), no qual estimula a liberação de glicocorticoides como a corticosterona (em roedores) pela glândula adrenal, sendo esse processo controlado pelo mecanismo de feedback negativo (JOSEPH; GOLDEN, 2016). Entretanto, a exposição ao estresse crônico, pode desregular esse mecanismo que retorna esses sistemas hormonais ao normal, levando ao aumento crônico de glicocorticoides no organismo devido a desregulação do eixo HPA (JOSEPH; GOLDEN, 2016), desregulação essa considerada um dos processos fisiopatológicos da depressão (OTTE et al., 2016).

Uma das formas de mimetizar esse processo de estresse crônico em animais é pela administração crônica da corticosterona. Nesse modelo são identificadas alterações bioquímicas condizentes às observadas no processo fisiopatológico da depressão, como mudanças nos níveis de tirosina hidroxilase (um marcador da síntese de dopamina) (ZHAO et al., 2008), redução dos níveis de glicogênio (ZHANG et al., 2015), Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (SHEN et al., 2016) e apoptose celular (ZOU et al., 2016). Ainda, alterações de parâmetros de estresse oxidativo também são relatadas em alguns estudos, como apresentado no quadro 1 (GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2015; SILVA et al., 2016). Além disso, vale ressaltar que ZHAO et al. (2008) observaram que o tratamento repetido com corticosterona (20 mg/Kg) induziu um comportamento tipo-depressivo em camundongos avaliado pelos testes TNF E TSC,

demonstrando que esse método é útil e consistente com outros modelos de depressão (ZHAO et al, 2008).

Ainda, é importante destacar que estudos tem indicado que roedores fêmeas são mais vulneráveis ao modelo de indução de depressão por estresse relacionado a desregulação do eixo HPA (ANTHONY et al. 2014). Shyla et al. (2014) em sua pesquisa mostrou que em um protocolo de indução de comportamento tipo-depressivo por estresse crônico, os camundongos BALB/cJ fêmeas apresentaram comportamentos do tipo-depressivos no TSC e aumento do corticosterona mais pronunciados que em machos

O comportamento tipo-depressivo pode ser avaliado através de testes comportamentais preditivos, como os mais utilizados TNF e TSC que são teste que avaliam o tempo de imobilidade dos animais (STERU et al., 1985). Ainda, outros testes como o Teste de borrifagem de sacarose (TBS), utilizado para rastreamento do comportamento tipo-anedônico, e o Teste do campo aberto (TCA) para avaliar a atividade locomotora, também são amplamente utilizados (MORETTI et al., 2012; ROSA et al., 2014; LIEBERKNECHT et al., 2017). Além disso, vale ressaltar que esses testes também são muito utilizados para investigar os efeitos de compostos com propriedades antidepressivas (MORETTI et al., 2012; ROSA et al., 2014; LIEBERKNECHT et al., 2017). Os detalhamentos destes testes estão descritos na metodologia desse projeto.

2.1.4 Tratamentos

Existem diversas formas de tratamento para depressão, sendo a principal a terapia farmacológica, que utiliza de medicamentos que agem sobre determinados mecanismos envolvidos em sua fisiopatologia. Como por exemplo os fármacos inibidores de recaptação de serotonina como a Fluoxetina, um dos principais antidepressivos indicados pela Organização Mundial da Saúde (KHAWAM; LAURENCIC; MALONE JR., 2006; WHO, 2017b). Entretanto, muitas vezes o uso desses antidepressivos provoca efeitos adversos como sonolência, espasmos musculares, boca seca, transpiração intensa, disfunção sexual, constipação, ganho de peso, náuseas, vômitos e tontura (KHAWAM; LAURENCIC; MALONE JR., 2006; BET et al., 2013). Esses efeitos aliados aos altos custos dos medicamentos levam muitos pacientes a abandonarem o tratamento (SANSONE; SANSONE, 2012; ALEKHIA et al., 2015) Pesquisas têm constatado que cerca de 50% dos pacientes interrompem o tratamento prematuramente (SANSONE; SANSONE,

2012; YAU et al., 2014; ALEKHYA et al., 2015). Na tentativa de contornar este obstáculo, investigações dos efeitos de tratamentos alternativos e complementares como psicoterapia, exercício físico e terapia nutricional têm sido sugeridos (MANOSSO; MORETTI; RODRIGUES, 2013; HALLGREN et al., 2017).

Dados na literatura ponderam que as abordagens terapêuticas baseadas em alimentos podem ter um direcionamento mais lento, porém mais fisiológico e sem efeitos colaterais graves (DADNHANIA et al., 2016), além da redução de custos para os cuidados com a saúde (MUSCARITOLI et al., 2016). Nessas circunstâncias, pesquisas têm indicado que a nutrição como terapia alternativa e/ou auxiliar tem notáveis efeitos positivos no tratamento de doenças crônicas como a depressão (SARRIS, 2017).

Estudos sugerem relevantes benefícios de nutrientes e alimentos no tratamento da depressão. Entre essas evidências, destaca-se as propriedades antidepressivas de alimentos como a cebola, orégano, alho, alecrim, café, ácido graxos, além de vitaminas e minerais (MANOSSO; MORETTI; RODRIGUES, 2013; BEYER; PAYNE, 2016). Mlyniec et al. (2014, 2015) constataram em seus artigos de revisão, que a suplementação com zinco, magnésio ou selênio pode melhorar a resposta dos fármacos antidepressivos ou até mesmo exibir efeito antidepressivo per se. Ainda, Sarris et al. (2016, 2017) concluíram em suas revisões que o uso de Ômega 3 e de vitaminas, incluindo a vitamina D, podem ter efeitos benéficos no tratamento da depressão.

2.2 VITAMINA D

2.2.1 Aspectos gerais

A vitamina D é um micronutriente bastante estudado desde sua descoberta em 1921 (NORMAN, 2012). Essa vitamina faz parte do grupo de vitaminas classificadas como lipossolúveis, além de ser considerada um hormônio esteroide (NORMAN, 2012; JOHNSON; MOHN, 2015). Ela é obtida nas formas de colecalciferol (vitamina D3) e ergocalciferol (vitamina D2), considerados os principais precursores biológicos inativos da vitamina D (PLUDOWSKI ET al., 2017).

Estes precursores da vitamina D são adquiridos através da exposição solar da pele, a principal forma de obtenção, pela dieta (principalmente através da ingestão de alimentos fontes, como óleo de fígado de bacalhau, salmão e gema de ovos, alimentos fortificados como leite, produtos lácteos e alguns cereais) e também através da sua

suplementação (JOHNSON; MOHN, 2015; PLUDOWSKIET al., 2017). Vale ressaltar que segundo a Recommended Dietary Allowances (RDA, 2011), a ingestão diária da vitamina D sugerida para atender as necessidades fisiológicas é de 600UI/d para crianças, adolescentes e adultos saudáveis. Porém, em casos de deficiência a recomendação pode chegar até 50.000UI/semana sem evidência de toxicidade (PLUDOWSKIET et al., 2017).

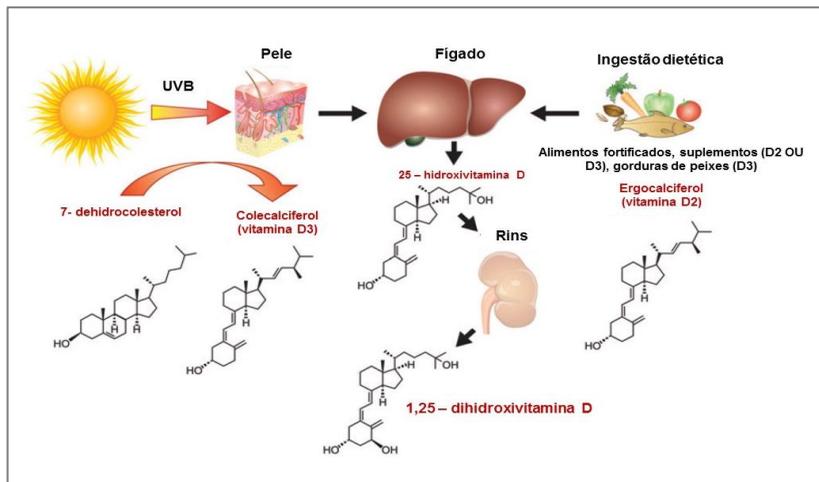
A vitamina D desempenha importantes funções biológicas, sendo a principal e mais conhecida a manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo, além da regulação da expressão gênica, proliferação e diferenciação celular e relação com o sistema imunológico e cerebral (NORMAN, 2012). Entretanto, vale ressaltar que para o desempenho dessas funções é necessário que a vitamina D esteja em sua forma ativa (BINKLEY; RAMAMURTHY; KRUEGER, 2012).

O metabolismo da vitamina D (Figura 1) começa quando seus precursores inativos (vitaminas D2 e D3) são absorvidos no intestino e/ou sintetizado pela pele. Uma vez dentro do organismo, vão para o fígado, no qual, por ações de enzimas, com a 25-hidroxilase, sofrem um processo de hidroxilação, tornando-se a forma 25, hidroxivitamina D [25(OH)D] ou Calcidiol (ANDERSON; MAY; MORRIS, 2003). A 25(OH)D é o maior metabólito circulante da vitamina D e também é considerada seu principal indicador, provavelmente em razão do seu tempo de meia vida, sua facilidade de mensuração e correlação com o estado clínico de doenças (ANDERSON; MAY; MORRIS, 2003).

Após formada, a 25(OH)D se liga às proteínas de ligação de vitamina D e segue até os rins pela corrente sanguínea, no qual sofre o segundo processo de hidroxilação, transformando-se em 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)D], também chamada de Calcitriol, sua forma ativa (Figura 1) (ANDERSON; MAY; MORRIS, 2003). Já ativada, a 1,25(OH)D vai para os tecidos e órgãos para realizar suas funções metabólicas reguladas pelos receptores intracelulares de vitamina D (VDR), receptores estes que podem ser encontrados em várias células e tecidos do corpo, incluindo o cérebro, que também é capaz de sintetizá-la. (ANDERSON; MAY; MORRIS, 2003; WRZOSEK et al., 2013).

Assim, devido ao seu metabolismo e as suas ações fisiológicas tem-se observado a ampla relevância da vitamina D para o estado clínico e prevenção de algumas doenças como osteoporose, raquitismo, doenças autoimunes e cardiovasculares, alguns tipos de cânceres, além de doenças do SNC como a depressão (BERNARD; CÓLON-EMÉRIC, 2010; GALESANU; MOCANU, 2015).

Figura 1: Metabolismo da Vitamina D



Fonte: Adaptado de Al Mheid et al., 2013

2.2.2 Vitamina D e depressão

Estudos têm indicado que a vitamina D possui um importante papel no desenvolvimento e funções do SNC. Entre suas principais ações no cérebro estão a diferenciação celular, regulação da sinalização do cálcio, produção de fatores neurotróficos, crescimento axonal, modulação da produção de EROS (EYLES; BURNE; MCGRATH, 2013) e até inibição da apoptose (MPANDZOU et al., 2016). Ainda, segundo Eyles, Burne e Mcgrath (2013), a vitamina D pode alterar a expressão dos neurotransmissores dos sistemas colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgico. A importância dessa vitamina pode ser explicada pela presença dos VDR e enzimas capazes de formar o calcitriol no cérebro (WRZOSEK et al., 2013). Um estudo realizado em camundongos verificou que o sistema vitamina D-VDR pode afetar significativamente o comportamento emocional, mostrando que a deficiência ou o bloqueio do receptor pode aumentar os sintomas de ansiedade (KALUEFF et al., 2004). Além disso, a carência da vitamina D está associada com o declínio cognitivo, maior frequência de

demência, entre outras doenças psiquiátricas (EYLES; BURNE; MCGRATH, 2013; VAN DER SCHAFT et al., 2013).

Pesquisas epidemiológicas com adultos e idosos apontam para uma associação entre baixos níveis de vitamina D e a presença de sintomas depressivos (SHIN et al., 2016; BROUWER-BROLSMA et al., 2016). Moy et al. (2016), verificaram em seu estudo transversal que 2/3 das mulheres malaias que apresentavam deficiência de vitamina D tinham maiores riscos para depressão quando avaliadas pela versão Malaia da Escala de Depressão, Ansiedade e Stress (DASS). (MOY et al., 2016). Vale destacar que estudos de revisão têm confirmado essa relação entre os níveis de vitamina D e a depressão, porém indicando a necessidade de testes randomizados e controlados para melhor entender a função dessa vitamina e seus mecanismos bioquímicos envolvidos na depressão (ANGLIN et al., 2013; PARKER; BROTCHE; GRAHAM, 2017).

Neste contexto, encontra-se na literatura científica alguns estudos em humanos. Mozaffari-Khosravi et al. (2013), em seu ensaio clínico randomizado controlado, verificaram que o grupo que recebeu injeção intramuscular de 300.000UI de vitamina D teve uma melhora no estado depressivo apresentando melhores resultados no Beck Depression Inventory (BDI) em comparação com o grupo controle. Sephrmanesh et al. (2016), também encontraram efeitos benéficos da suplementação com vitamina D nos parâmetros BDI e de estresse oxidativo em indivíduos suplementados com essa vitamina durante 8 semanas (50.000UI/semana). Além disso, um outro estudo de 8 semanas mostrou que o uso da vitamina D (1500 UI/dia) como terapia adjuvante em combinação com a fluoxetina (20 mg/dia), teve melhores resultados em comparação com a fluoxetina isolada, no tratamento dos sintomas depressivos (KHORAMINYA et al., 2013). Entretanto, segundo Parker, Brotchie e Graham (2017) esses poucos estudos têm produzido resultados ainda inconsistente e geralmente apresentam limitações metodológicas, havendo assim a necessidade de mais estudos.

Alguns estudos experimentais também têm investigado os efeitos da suplementação com vitamina D sobre o SNC. Pesquisas mostraram que a administração de vitamina D melhorou o declínio da função cognitiva em ratos diabéticos e com doença hepática gordurosa (ERBAS et al., 2014; ALREFAIE; ALHAYANI, 2015). Ainda, foi demonstrado que a administração desse nutriente reduziu o fator de transcrição NF-KB (Fator nuclear kappa B) e aumentou as concentrações do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo de ratos obesos (HAJILUIAN et al., 2017), além de melhorar a transmissão colinérgica

no córtex pré-frontal de ratos (ALREFAIE; ALHAYANI, 2015). Além disso, Fedotova et al. (2016, 2017) observaram que a suplementação com Colecalciferol nas dosagens de 5 mg/kg/dia e 1 mg/kg/dia ou 2,5 mg/kg/dia, por 14 dias, tiveram efeitos tipo-antidepressivos e tipo-ansiolíticos, respectivamente, em ratas ovariectomizadas.

Um outro indicativo que mostra a importância da vitamina D no SNC são as evidências dos seus efeitos na atenuação de estresse oxidativo cerebral. Pesquisas *in vitro* e *in vivo*, sugeriram em seus resultados que o colecalciferol tem um potencial antioxidante capaz de prevenir a auto-oxidação, peroxidação lipídica, além de aumentar as atividades da enzima CAT (CHEN; LIN; CHIU, 2003; LIN; CHEN; CHAO, 2005; TARBALI; KHEZRI, 2016). Ainda, um ensaio *in vitro* demonstrou que a forma ativa do Colecalciferol [1alfa, 25(OH)2D3] inibiu o aumento intracelular de EROS em uma cultura mesencefálica (IBI et al., 2001). Por fim, é fundamental salientar que este parâmetro, como já citado, tem grande relevância no processo fisiopatológico da depressão.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da administração de 100 UI/kg/dia de Colecalciferol, nos parâmetros comportamentais e de estado redox, em camundongos submetidos a um modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona.

3.2 OBEJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do Colecalciferol sobre os parâmetros comportamentais no TSC, TCA e TBS em camundongos.

- Investigar o efeito da administração do colecalciferol sobre os parâmetros de estado redox (DCF) na região hipocampal e do córtex pré-frontal de camundongos.

4 MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo é caracterizado como experimental animal e foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da Depressão da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O projeto foi enviado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo número PP00795, ANEXO 1). Além disso, é importante destacar que os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.2 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados usando camundongos Swiss fêmeas com idade entre 60 e 90 dias, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram alojados em caixas coletivas (12 animais por caixa), com livre acesso a água e ração comercial para roedores. As condições ambientais foram controladas a fim de manter a temperatura de 20 - 22°C e um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00 h).

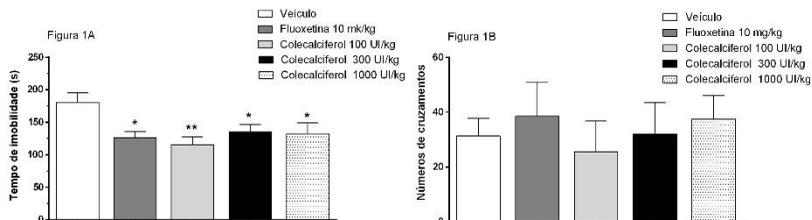
4.3 ESTUDO PILOTO

Inicialmente, foi realizado um estudo piloto para determinação da dose efetiva do colecalciferol no teste de suspensão pela cauda (TSC). Para isso, três doses de colecalciferol foram testadas. Camundongos Swiss fêmeas (n=35) foram divididos nos seguintes grupos: 1) veículo (grupo controle); 2) fluoxetina (10 mg/kg, controle positivo); 3) colecalciferol 100 UI/kg/dia, 4) colecalciferol 300 UI/kg/dia, 5) colecalciferol 1000 UI/kg/dia.

Os animais foram tratados por via oral (gavagem) durante 21 dias. Vinte e quatro horas após a última administração dos compostos, os animais foram submetidos ao TSC e teste de campo aberto (TCA), conforme os protocolos dos itens 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente. Observou-se que todas as doses de colecalciferol foram efetivas em mostrar um efeito tipo-antidepressivo em relação ao grupo controle, e foram comparáveis aos resultados da fluoxetina (Figura 2). Desta forma,

foi escolhida a menor dose de 100 UI/kg/dia para realização desse estudo.

Figura 2. Efeito do tratamento (21 dias) com veículo, fluoxetina ou Colecalciferol (Vitamina D3) no TSC (figura 2A) e TCA (figura 2B)



TSC: Teste de suspensão pela cauda; TCA: Teste do campo aberto. Cada coluna representa a média + EPM, de 7 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido por teste post-hoc de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle. Fonte: A autora

4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

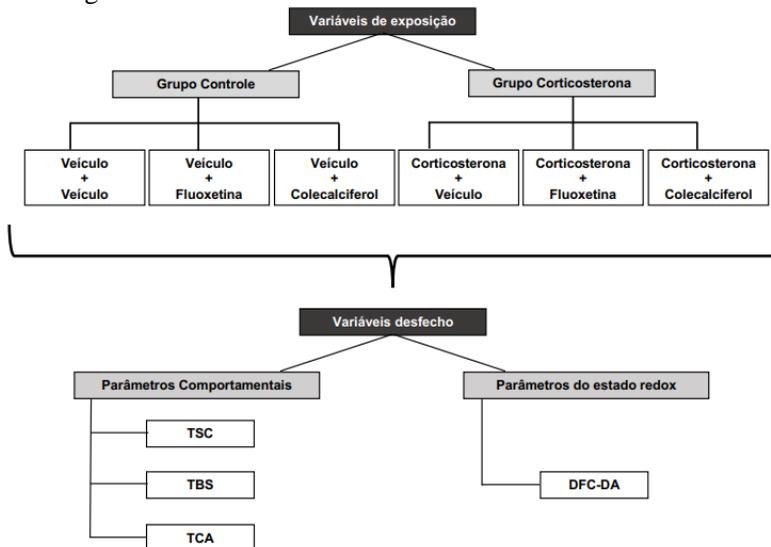
Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados 48 camundongos, os quais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (Figura 3):

1) Grupo controle sem administração da corticosterona, o qual foi subdividido em: a) veículo (água destilada) + veículo (óleo de girassol); b) veículo (água destilada) + fluoxetina; c) veículo (água destilada) + colecalciferol.

2) Grupo experimental com administração da corticosterona, o qual foi subdividido em: a) corticosterona + veículo (óleo de girassol); b) corticosterona + fluoxetina; c) corticosterona + colecalciferol.

Esses grupos receberam o tratamento (como descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2) diariamente (sempre às 13h30min). Vinte e quatro horas após a última administração dos compostos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

Figura 3. Fluxograma do estudo



TSC: Teste de suspensão pela cauda; TBS: Teste de borrfagem de sacarose; TCA: Teste do campo aberto; DCF-DA: Diclorofluoresceína.

Fonte: A autora, 2017

4.4.1 Vitamina D e depressão Indução do comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de corticosterona

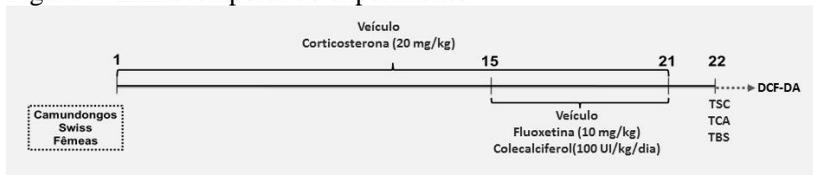
Os camundongos foram tratados por via oral (gavagem), com 20 mg/kg de corticosterona ou veículo (água destilada) durante 21 dias para a indução do comportamento tipo-depressivo (Figura 4), conforme Rosa et al. (2014). A corticosterona foi dissolvida em água destilada com 2% de Tween 80 e 0,2% de dimetilsulfóxido (DMSO). E para evitar qualquer possível efeito desses solventes os veículos (água destilada) de cada grupo também receberam a mesma quantidade em porcentagem de DMSO e Tween 80.

4.4.2 Investigação do efeito da colecalciferol no modelo de depressão induzida por corticosterona

A fim de verificar o efeito tipo-antidepressivo da colecalciferol, as dosagens de 100 UI/kg/dia de colecalciferol, o veículo (óleo de girassol) ou 10 mg/kg de fluoxetina (controle positivo) foram

administradas imediatamente após a administração da corticosterona, durante os últimos 7 dias da administração da corticosterona (Figura 4) (Adaptado de Rosa et al., 2014).

Figura 4. Linha temporal do experimento



TSC: Teste de suspensão pela cauda; TBS: Teste de borrifagem de sacarose; TCA: Teste do campo aberto; DCF-DA: Diclorofluoresceína

Fonte: Adaptado de Rosa et al, 2017

4.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

4.5.1 Teste da suspensão pela cauda (TSC)

Esse teste é baseado na avaliação do tempo de imobilidade do animal, o qual é avaliado de acordo com o método descrito por Steru et al. (1985). Os camundongos foram suspensos 50 cm acima do chão pela cauda, a qual foi fixada com fita adesiva em uma superfície lisa. O tempo de imobilidade foi registrado durante 6 minutos. No modelo de depressão induzida por corticosterona é observado o aumento do tempo de imobilidade neste teste (Zhao et al., 2008, Rosa et al., 2014). Uma redução do tempo de imobilidade é observada após a administração de compostos com propriedades antidepressivas (Steru et al., 1985).

4.5.2 Teste do campo aberto (TCA)

Com o objetivo de eliminar a possibilidade de que alterações no tempo de imobilidade no TSC sejam devidos a uma modificação na atividade locomotora dos animais causada pelos compostos, os camundongos foram submetidos a uma sessão no TCA, como descrito por Rodrigues et al., (1996). O teste foi realizado 10 minutos após o TSC, em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas (cruzamentos) foi registrado em uma sessão de 6

minutos. O aparelho foi limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes, a fim de esconder rastros de outros animais.

4.5.3 Teste de borrifagem de sacarose

O TBS é utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (grooming) dos animais, após a vaporização dos mesmos com solução de sacarose a 10%. Tal teste foi realizado 10 minutos após o TCA. O tempo de latência e o tempo total de auto-limpeza foram avaliados durante 5 minutos. O TBS é um marcador válido de comportamento tipo-anedônico para modelos de indução ao estresse, uma vez que os animais submetidos a estes modelos apresentam um menor tempo de auto-limpeza quando comparados aos animais controle (Kalueff et al, 2002; Moretti et al., 2012).

4.6 EUTANÁSIA

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram decapitados (sem o uso de anestesia) e tiveram seus encéfalos removidos e dissecados sobre a placa de Petri invertida sobre o gelo para retirada dos tecidos hipocampo e córtex pré-frontal. Esses tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80° para posterior realização de dosagens bioquímicas.

4.7 MENSURAÇÃO DO ESTADO REDOX

A mensuração do parâmetro do estado redox foi realizada a partir de amostras armazenadas de tecidos do hipocampo e córtex pré-frontal. As amostras foram homogeneizadas em tampão TFK 50mM, EDTA 1mM e azida sódica 1 mM (pH 7,4) (1:10 peso/volume) e centrifugadas a 1000g em uma temperatura de 4°C , por 10min. O sobrenadante foi separado para realização dos ensaios bioquímicos. Os parâmetros analisados foram os níveis de DCF-DA.

4.7.1 Determinação do DCF-DA

Esse método foi utilizado para determinar EROS através de reação fluorimétrica com o 2, 7 diclorofluoresceína (DCFH) que é a forma não fluorescente deste composto. Esta reage com EROS formando o a diclorofluoresceína (DCF) corante que emite fluorescência e pode ser quantificado de acordo como descrito por Hempel et al.,

(1999). Sendo assim, a análise da produção de EROS foi feita através da leitura na Multileitora Infinite M200 (Tecan), com excitação em 585nm e emissão de 520nm em amostras previamente incubadas com DCFH. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária de fluorescência, com o grupo controle sendo expresso como 100% e os demais grupos calculados em comparação a esse valor.

4.7.2 Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado pelo método colorimétrico, utilizando a albumina bovina sérica como padrão (LOWRY et al., 1951).

4.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram apresentados em média \pm EPM. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias, seguidos do teste post hoc de Newman Kewlls, quando apropriado. Para realização dos testes foi utilizado o software Statistica 7.0. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados provenientes do projeto de dissertação serão submetidos na forma de artigo ao periódico PHARMACOLOGY, BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR que tem o fator de impacto (2017) de 2.538, cujo o qualis para Nutrição é A2. As normas de submissão ao periódico desejado estão disponíveis no seguinte link: <https://www.elsevier.com/journals/pharmacology-biochemistry-and-behavior/0091-3057/guide-for-authors>

EFEITOS DO COLECALCIFEROL NOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR CORTICOSTERONA

RESUMO:

O transtorno depressivo maior (ou depressão) é uma das doenças psiquiátricas mais frequentes na população, tendo o estresse crônico como um dos principais fatores etiológicos. Alguns estudos clínicos têm demonstrado que a suplementação da vitamina D pode levar a atenuação do estado depressivo. Porém, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos nessa relação entre a vitamina D e a depressão. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da administração crônica de 100 UI/kg/dia de colecalciferol em parâmetros comportamentais [teste de suspensão pela cauda (TSC), teste do campo aberto (TCA) e teste de borrifagem de sacarose (TBS)] e de estado redox [diclorofluoresceína (DCF)], em camundongos submetidos a um modelo de depressão induzida pela administração crônica corticosterona, o principal hormônio do estresse em animais. Para realização desse estudo, foram utilizados camundongos adultos Swiss fêmeas. Para indução do comportamento tipo-depressivo, a corticosterona (20 mg/kg) foi administrada uma vez ao dia, durante 21 dias. Para a investigação do efeito tipo-antidepressivo, o colecalciferol (100 UI/kg) ou a fluoxetina (10 mg/kg, controle positivo) foram administrados nos últimos 7 dias da administração de corticosterona. Após os tratamentos, foram realizados os testes comportamentais e análises bioquímicas em amostras de hipocampo e córtex pré-frontal dos roedores. Os animais submetidos às doses repetidas de corticosterona

apresentaram um comportamento do tipo-depressivo, evidenciado pelo aumento significativo do tempo de imobilidade no TSC, o qual foi reduzido significativamente com a administração da colecalciferol ou fluoxetina. Além disso, os grupos tratados com colecalciferol ou fluoxetina apresentaram menor porcentagem da unidade arbitrária de fluorescência de DCF, indicando menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no hipocampo. Estes resultados mostraram que o colecalciferol, similar à fluoxetina, tem um potencial efeito tipo-antidepressivo, o qual pode estar relacionado à menor produção de EROS no hipocampo.

PALAVRAS-CHAVES: Colecalciferol; Depressão; Corticosterona; EROS; Hipocampo; Estado redox.

DESTAQUES:

- A suplementação de colecalciferol reverteu o comportamento do tipo-depressivo em camundongos submetidos ao tratamento com corticosterona.
- A suplementação de colecalciferol atenuou a produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo dos camundongos.
- Os efeitos da colecalciferol foi similar aos da fluoxetina (controle positivo).

ABREVIACÕES:

DCF – Diclorofluoresceína; DCFH - 2, 7 diclorofluoresceína; DMSO - Dimetilsulfóxido; EROS - Espécies reativas de oxigênio; HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal; NADPH –Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; TBS - Teste de borrifagem de sacarose; TCA - Teste do campo aberto; TNF - Teste do nado forçado; TSC - Teste de suspensão pela cauda; VDR - Receptores intracelulares de vitamina D

1. Introdução

A depressão é um transtorno psiquiátrico que tem como principal característica o humor deprimido e anedonia, e está entre os que mais causam incapacidade no mundo. Cerca de 300 milhões de indivíduos são diagnosticados com depressão, sendo mulheres e idosos as populações mais acometidas (WHO, 2017a). A principal forma de tratamento da depressão consiste no uso de fármacos antidepressivos, como a fluoxetina (Khawam et al., 2006; WHO, 2017b). No entanto, nem todos os pacientes aderem ao tratamento farmacológico, ou mesmo sentem melhoras significativas com o seu uso (Sansone e Sansone, 2012; Yau et al., 2014; Alekhya et al., 2015). Entre os principais motivos da não-aderência ao tratamento farmacológico estão os efeitos colaterais como sonolência, disfunção sexual, constipação, ganho de peso, náuseas, vômitos e tontura (Khawam et al., 2006; Bet et al., 2013). Na tentativa contornar este obstáculo, investigações dos efeitos de novas alternativas de tratamento como psicoterapia, exercício físico e terapia nutricional têm sido sugeridos (Hallgren et al., 2017; Manosso et al., 2013).

Estudos têm evidenciado efeitos benéficos de nutrientes como vitaminas para o tratamento da depressão (Manosso et al., 2013; Beyer e Payne, 2016). Uma das vitaminas, cujos possíveis efeitos antidepressivos vêm sendo observados, é a vitamina D. Além de estudos epidemiológicos evidenciarem que indivíduos diagnosticados com depressão apresentam deficiência desse micronutriente (Shin et al., 2016; Brouwer-Brolsma et al., 2016), alguns estudos clínicos têm observado que a suplementação pode levar a melhoras no estado depressivo dos pacientes (Mozaffari-Khosravi et al., 2013; Sephrmanesh et al., 2016). Além disso, pesquisas experimentais têm observado que o colecalciferol (vitamina D3) pode apresentar efeitos benéficos ao sistema nervoso central, como melhora no declínio cognitivo (Erbas et al., 2014; Alrefaie e Alhayani, 2015), melhora na síntese de neurotransmissores (Eyles et al., 2013) e atenuação do estresse oxidativo cerebral (Chen et al., 2003; Tarbali e Khezri, 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre a função dessa vitamina e seus mecanismos bioquímicos envolvidos na depressão.

Modelos experimentais que tentam mimetizar comportamentos do tipo-depressivos têm sido uma estratégia para tentar compreender a gênese da depressão, bem como investigar os efeitos de novos tratamentos. A administração de doses repetidas de corticosterona tem sido considerado um método válido e consistente para a indução do

comportamento tipo depressivo em camundongos (Zhao et al., 2008). A corticosterona é o principal hormônio do estresse em roedores, sendo este modelo baseado na desregulação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) (Joseph e Golden, 2016). Este modelo mimetiza o estado de estresse crônico, um dos principais fatores etiológicos da depressão (Otte et al., 2016). Além disso, nesse modelo é observado processos bioquímicos que tem sido implicado na fisiopatologia da depressão, como o processo de estresse oxidativo (Gupta et al., 2015; Liu et al., 2015; Silva et al., 2016). Alguns estudos têm evidenciado sinais de danos oxidativos como altas concentração de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica tanto em amostras de urina de pessoas diagnosticadas com depressão quanto nos tecidos do hipocampo e córtex pré-frontal de animais submetidos à modelos experimentais de depressão (Han et al, 2016; Silva et al., 2016). Além disso, também são observadas alterações dos parâmetros do estado redox como diminuição da capacidade antioxidante sérica em indivíduos depressivos (Liu et al., 2015) e elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no hipocampo e córtex pré-frontal em camundongos (Zhang et al., 2016).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da administração de 100 UI/kg/dia de colecalciferol, em parâmetros comportamentais e de estado redox em camundongos submetidos a um modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Os experimentos foram realizados usando camundongos Swiss fêmeas com idade entre 60 e 90 dias, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram alojados em caixas coletivas (12 animais por caixa), com livre acesso a água e ração comercial para roedores. As condições ambientais foram controladas a fim de manter a temperatura de 20 - 22°C e um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00 h). Os animais foram usados seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética da instituição. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

2. 2 Tratamento farmacológico

Inicialmente, foi realizado um estudo piloto para determinação da dose efetiva do colecalciferol no teste de suspensão pela cauda (TSC). Para isso, três doses de colecalciferol foram testadas. Camundongos Swiss fêmeas (n=35) foram divididos nos seguintes grupos: 1) veículo (grupo controle); 2) fluoxetina (10 mg/kg, controle positivo); 3) colecalciferol 100 UI/kg/dia, 4) colecalciferol 300 UI/kg/dia, 5) colecalciferol 1000 UI/kg/dia.

Considerando as ações genômicas do colecalciferol, inicialmente sugerimos que ele poderia ter efeitos tipo-antidepressivos após o tratamento crônico, e assim os animais foram tratados por via oral (gavagem) com veículo, colecalciferol ou fluoxetina uma vez ao dia por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última administração dos compostos, os animais foram submetidos a TSC e teste de campo aberto (TCA).

A dose de 100 UI/kg/dia foi escolhida para avaliar os efeitos do colecalciferol no modelo de depressão induzido pela corticosterona. Para induzir o comportamento tipo-depressivo os camundongos foram tratados por via oral (gavagem), com 20 mg/kg de corticosterona ou veículo (água destilada) durante 21 dias, conforme Rosa et al. (2014). A corticosterona foi dissolvida em água destilada com 2% de Tween 80 e 0,2% de dimetilsulfóxido (DMSO). E para evitar qualquer possível efeito desses solventes os veículos (água destilada) de cada grupo também receberam a mesma quantidade em porcentagem de DMSO e Tween 80.

A fim de verificar o efeito tipo-antidepressivo da colecalciferol, as dosagens de 100 UI/kg/dia de colecalciferol, o veículo (óleo de girassol) ou 10 mg/kg de fluoxetina (controle positivo) foram administradas imediatamente após a administração da corticosterona, durante os últimos 7 dias da administração da corticosterona (Adaptado de Rosa et al., 2014).

Os animais (n=48) foram divididos aleatoriamente conforme os grupos a seguir: a) veículo + veículo (óleo de girassol); b) veículo + fluoxetina; c) veículo + colecalciferol; d) corticosterona + veículo (óleo de girassol); e) corticosterona + fluoxetina; f) corticosterona + colecalciferol. Esses grupos receberam o tratamento diariamente (sempre às 13h30min). Vinte e quatro horas após a última administração dos compostos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

2. 3 Análise comportamental

2. 3. 1 Teste da suspensão pela cauda (TSC)

Esse teste é baseado na avaliação do tempo de imobilidade do animal, o qual é avaliado de acordo com o método descrito por Steru et al. (1985). Os camundongos foram suspensos 50 cm acima do chão pela cauda, a qual foi fixada com fita adesiva em uma superfície lisa. O tempo de imobilidade foi registrado durante 6 minutos. No modelo de depressão induzida por corticosterona é observado o aumento do tempo de imobilidade neste teste (Zhao et al., 2008, Rosa et al., 2014). Uma redução do tempo de imobilidade é observada após a administração de compostos com propriedades antidepressivas (Steru et al., 1985).

2. 3. 2 Teste do campo aberto (TCA)

Com o objetivo de eliminar a possibilidade de que alterações no tempo de imobilidade no TSC sejam devidos a uma modificação na atividade locomotora dos animais causada pelos compostos, os camundongos foram submetidos a uma sessão no TCA, como descrito por Rodrigues et al., (1996). O teste foi realizado 10 minutos após o TSC, em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas (cruzamentos) foi registrado em uma sessão de 6 minutos. O aparelho foi limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes, a fim de esconder rastros de outros animais.

2. 3. 3 Teste de borrifagem de sacarose (TBS)

O TBS é utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (grooming) dos animais, após a vaporização dos mesmos com solução de sacarose a 10%. Tal teste foi realizado 10 minutos após o TCA. O tempo de latência e o tempo total de auto-limpeza foram avaliados durante 5 minutos. O TBS é um marcador válido de comportamento tipo-anedônico para modelos de indução ao estresse, uma vez que os animais submetidos a estes modelos apresentam um menor tempo de auto-limpeza quando comparados aos animais controle (Kalueff et al, 2002; Moretti et al., 2012).

2. 4 Determinação do DCF- DA

As mensurações do DCF-DA foram realizadas a partir de amostras de tecidos do hipocampo e córtex pré-frontal. As amostras foram homogeneizadas em 50mM tampão fosfato salino pH 7,4, EDTA 1mM e azida sódica 1 mM (1:10 peso/volume) e centrifugadas a 1000g em uma temperatura de 4°C, por 10min. O sobrenadante foi reservado para realização dos ensaios bioquímicos.

A determinação do DCF-DA foi utilizado para determinar a produção de EROS através de reação fluorimétrica com o 2, 7 diclorofluoresceína (DCFH), que é a forma não fluorescente deste composto. O DCFH reage com EROS formando o a diclorofluoresceína (DCF), corante que emite fluorescência e pode ser quantificado de acordo como descrito por Hempel et al., (1999). Sendo assim, a análise da produção de EROS foi feita através da leitura na Multileitora Infinite M200 (Tecan), com excitação em 585nm e emissão de 520nm em amostras previamente incubadas com DCFH. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária de fluorescência, com o grupo controle sendo expresso como 100% e os demais grupos calculados em comparação a esse valor.

2. 5 Determinação de Proteínas

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado pelo método colorimétrico, utilizando a albumina bovina sérica como padrão (Lowry et al., 1951).

2. 6 Processamento e análise dos dados

Os dados foram apresentados em média \pm EPM. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias, seguidos do teste post hoc de Newman Kewlls, quando apropriado. Para realização dos testes foi utilizado o software Statistica 7.0. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

3. 1 O colecalciferol apresenta efeito tipo-antidepressivo comparável à fluoxetina

Após 21 dias de tratamento, nós observamos que todas as doses do colecalciferol foram efetivas em mostram um efeito tipo-antidepressivo, e foram comparáveis ao resultado da fluoxetina (Figura 1). Assim, a menor dose (100 UI/kg) foi escolhida para esse estudo.

Na figura 2A são apresentados os resultados do efeito da administração de veículo, fluoxetina ou colecalciferol sobre o tempo de imobilidade no TSC, após o tratamento com corticosterona. A administração crônica (21 dias) de corticosterona aumentou significamente o tempo de imobilidade dos animais ($p < 0,01$), sugerindo um comportamento tipo-depressivo. O tratamento com colecalciferol provocou um efeito tipo-antidepressivo, uma vez que reverteu o aumento do tempo de imobilidade ($p < 0,01$) induzido pela corticosterona. Este resultado foi comparável ao grupo tratado com fluoxetina ($p < 0,01$).

A figura 2B mostra os resultados do TCA. Observou-se que não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), sugerindo que o tratamento com corticosterona, colecalciferol ou fluoxetina não causam alterações motoras aos animais. Na figura 3 são apresentados os resultados do TBS. Não foi observado efeitos dos tratamentos no tempo de autolimpeza dos animais, tanto no tempo de latência para o primeiro grooming ($p > 0,05$) (Figura 3A) quanto no tempo total de limpeza ($p > 0,05$) (Figura 3B).

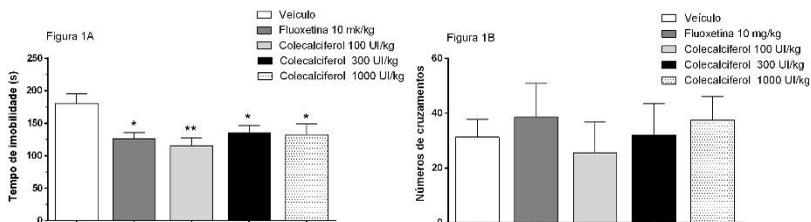


Figura 1. Efeito do tratamento (21 dias) com veículo, fluoxetina ou colecalciferol no TSC (figura 1A) e TCA (figura 1B). Cada coluna representa a média + EPM. de 7 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido por teste post-hoc de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle. TSC: Teste de suspensão pela cauda; TCA: Teste do campo aberto.

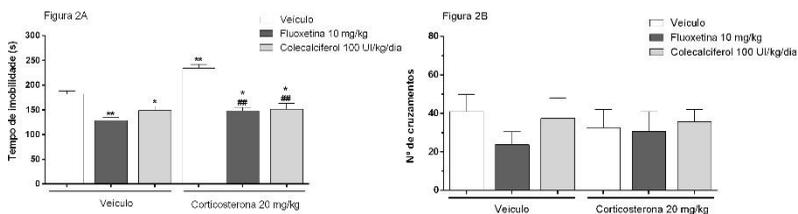


Figura 2. Efeito do tratamento de 7 dias com veículo, fluoxetina ou colecalciferol no tempo de imobilidade no TSC (Fig. 2A) e atividade locomotora no TCA (Fig. 2B) em camundongos submetidos a 21 dias de administração de corticosterona. Cada coluna apresenta a média \pm EPM ($n=7$). * $p<0,05$ ** $p<0,01$ comparado com o grupo controle. ### $p<0,01$ comparado com o grupo veículo + corticosterona (ANOVA de duas vias, seguida de teste post hoc de Newman-Keuls).

TSC: Teste de suspensão pela cauda; TCA: Teste do campo aberto.

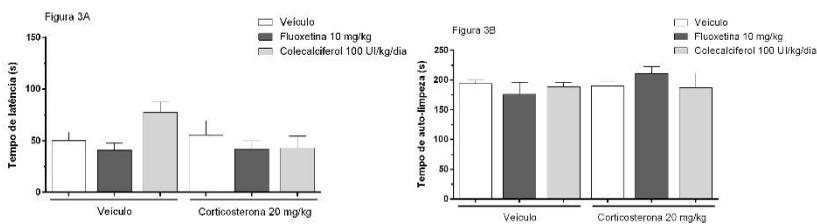


Figura 3. Efeito do tratamento de 7 dias com veículo, fluoxetina ou colecalciferol no tempo de latência (Fig. 3A) e tempo total de autolimpeza (Fig. 3B) no TBS em camundongos submetidos a 21 dias de administração de corticosterona. Cada coluna apresenta a média \pm EPM ($n=7$). (ANOVA de duas vias).

TBS: Teste de borrifagem de sacarose

3. 2 O tratamento com colecalciferol atenuou a produção de EROS no hipocampo dos camundongos.

Na figura 4 estão apresentados os efeitos do tratamento de 7 dias com veículo, fluoxetina ou colecalciferol na produção de espécies reativas de oxigênio, nas regiões da hipocampo e córtex pré-frontal. Observou-se que os grupos tratados com a colecalciferol ou fluoxetina tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) porcentagem da unidade arbitrária de fluorescência de DCF, indicando menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no hipocampo (Figura 4A). Na região do córtex pré-frontal não foi constatado nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 4B).

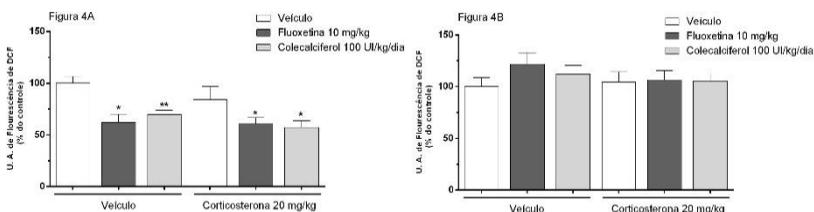


Figura 4. Efeito do tratamento de 7 dias com veículo, fluoxetina ou colecalciferol na produção de espécies reativas de oxigênio (expresso em U. A. de fluorescência) no hipocampo (Fig. 4A) e córtex pré-frontal (Fig. 4B) de camundongos. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=6-8). **p < 0,001 e *p < 0,005 comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc da Newman-Keuls). U. A.: Unidade arbitrária

4. Discussão

Neste trabalho foi observado que a suplementação de 100 UI/kg/dia de colecalciferol apresentou um efeito similar ao da fluoxetina (controle positivo) na reversão do comportamento do tipo-depressivo em camundongos submetidos a administração crônica de corticosterona, bem como na atenuação da produção de EROS no hipocampo dos camundongos.

A administração crônica de corticosterona tem sido considerado um modelo experimental útil e consistente na mimetização dos comportamentos tipo depressivos em roedores (Zhao et al., 2008), tornando este modelo de grande valia para investigar não somente os

mecanismos fisiopatológicos da depressão como também os efeitos de terapias e novos fármacos para o tratamento dessa doença. Estudos têm evidenciando que doses repetidas de corticosterona levam a alterações nos TSC e teste do nado forçado (TNF), que são testes preditivos muito utilizados para avaliar o comportamento tipo-depressivo e também rastreamento de compostos com propriedades tipo-antidepressivas em animais (Zhao et al. 2008; Rosa et al. 2014; Gupta et al. 2015). Corroborando com isso, em nossa pesquisa foi observado que os camundongos submetidos a administração crônica de corticosterona apresentaram um comportamento do tipo-depressivo, determinado pelo maior tempo de imobilidade no TSC em comparação com o grupo controle.

Ainda, animais submetidos a protocolos de indução de depressão pela administração crônica de corticosterona, podem apresentar um comportamento do tipo-anedônico evidenciado pela redução do tempo de autolimpeza. (Rosa et al., 2014; Camargo et al., 2018). Porém, não foi encontrado nenhuma alteração significativa no tempo de autolimpeza dos animais em nosso estudo. De acordo com nossos resultados, Olescowicz et al. (2017) também não observou um comportamento tipo-anedônico em camundongos Swiss fêmeas submetidas a doses repetidas de corticosterona no TBS. Essas diferentes respostas podem estar relacionadas à vários fatores como a variabilidade de respostas das cepas, estresse decorrente ao processo e manuseio em que os camundongos foram submetidos, bem como a influência sexo dos animais (Curtis et al., 2004; Balcombe et al., 2004; Yalcin et al., 2008).

A indução do comportamento tipo-depressivo em roedores tem sido bastante utilizada para investigar os eventuais efeitos de novos tratamentos como terapias nutricionais através da suplementação de nutrientes (Manosso et al, 2013). Com destaques para vitaminas, Moretti et al. (2012, 2013) sugeriram que o ácido ascórbico (vitamina C) pode ser uma alternativa para a atenuação do comportamento tipo-depressivo em animais sujeitos a modelos de depressão induzidos por estresse crônico imprevisível e estresse de contenção. Rosa et al. (2014), observaram que o ácido fólico (vitamina B9) também tem um provável efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona.

Em nosso estudo foi confirmado o efeito tipo-antidepressivo da administração de 100 UI/kg/dia de colecalciferol (Vitamina D3). Os grupos tratados com esse micronutriente apresentaram uma diminuição significativa do tempo de imobilidade no TSC, tanto em comparação ao grupo controle, quanto aos animais submetidos à corticosterona (Figura

2A). Esse efeito foi semelhante ao observado nos grupos tratados com fluoxetina (controle positivo). Corroborando com os nossos resultados, um estudo realizado com ratas ovariectomizadas concluiu que a colecalciferol na dosagem de 5 mg/kg/dia (\equiv 200.000 UI), durante 14 dias, também apresentou uma ação tipo-antidepressiva no TNF (Fedotova et al, 2016). Outro estudo, também identificou que 2,5 μ g/kg/dia (\equiv 100 UI) de colecalciferol, nos últimos 7 dias de administração crônica de corticosterona, atenuou o comportamento tipo-depressivo em camundongos machos no TSC (Camargo et al., 2018).

Esse potencial efeito antidepressivo do colecalciferol tem sido bastante relatada na literatura científica através de estudos observacionais e clínicos (Anglin et al., 2013; Parker et al., 2017). Porém, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na relação entre essa vitamina e a depressão. Entretanto, sabe-se que há muitas vias e mecanismos envolvidos no desenvolvimento desse transtorno. Além dos mais elucidados como alterações nos sistemas neurotransmissores glutamatérgico e monoaminérgico (Sanacora et al, 2012; Otte et al., 2016), os danos oxidativos, assim como em outras doenças neurológicas, também têm sido implicados na fisiopatologia da depressão (Smaga et al., 2015; Manoharan et al., 2016). Um dos fundamentos para essa associação é o fato do tecido nervoso ser muito sensível ao processo de estresse oxidativo, devido ao seu elevado teor de lipídios e da alta demanda de oxigênio (Moniczewski et al., 2015).

Observou-se que alguns biomarcadores do estado redox, como a diminuição da capacidade antioxidante e o aumento da produção de EROS, aparecem alterados no transtorno depressivo (Liu et al., 2015; Silva et al. 2016; Zhang et al., 2016). Desta forma, parâmetros de estado redox são bastante utilizados nos estudos para verificar a participação deste sistema na fisiopatologia de doenças neuropsiquiátricas como a depressão. Em nosso trabalho, observamos que houve uma diminuição significativa na produção de EROS nos grupos tratados com colecalciferol e fluoxetina, na região do hipocampo (Figura 4A). Este achado sugere um possível mecanismo para o efeito tipo-antidepressivo do colecalciferol. Sabe-se que produção excessiva de EROS ou a diminuição de defesas antioxidantes pode causar danos oxidativos (Moniczewski et al., 2015), que podem alterar as funções fisiológica das células (Maurya et al, 2016), ou até mesmo levar à apoptose (Circu e Aw, 2010), implicando no desenvolvimento da depressão (Maurya et al., 2016).

Esse efeito da vitamina D na atenuação de EROS, também foi observado em outros estudos. Yang et al. (2016) demonstraram que a 1,25 dihidroxivitamina D ou calcitriol, a forma ativa da vitamina D, inibiu a produção de EROS e apoptose em culturas de células mesoteliais peritoneais. Manna et al. (2017) observaram que a suplementação de 67 UI/Kg/dia de calcitriol, reduziu a produção de EROS em culturas de adipócitos e tecido adiposo de camundongos diabéticos. No tecido cerebral, um ensaio in vitro demonstrou que o calcitriol inibiu o aumento intracelular de EROS em uma cultura mesencefálica (Ibi et al., 2001). Essa ação inibitória da vitamina D na produção de EROS pode estar sendo regulado por muitas vias de sinalização. Uma das sugestões na literatura são as vias mediadas pelo sistema de enzimas NADPH oxidase (NOX), uma das principais fontes de produção intracelular de EROS (Kim et al, 2015). Estudos mostraram que o tratamento com a calcitriol atenuou a expressão de NOX nas células neurais (Cui et al., 2017) e do tecido adiposo (Manna et al., 2017). Ainda, é importante destacar que além dos nossos achados, alguns dados têm evidenciado um importante papel neuroprotetor da vitamina D. Pesquisas experimentais têm mostrado que ela pode melhorar o declínio cognitivo (Erbas et al., 2014; Alrefaie e Alhayani, 2015), inibir a morte celular (Mpandzou et al., 2016), além de melhorar a síntese de neurotransmissores (Eyles et al., 2013). Esses feitos podem ser explicados pela presença dos receptores de vitamina D (VDR) e enzimas capazes de formar o calcitriol no cérebro (Wrzosek et al., 2013). Um estudo realizado com camundongos verificou que o sistema vitamina D-VDR pode afetar significamente o comportamento emocional, mostrando que a deficiência ou o bloqueio do receptor pode aumentar os sintomas de ansiedade (Kalueff et al., 2004).

O nosso trabalho é um dos poucos a estudar os efeitos da colecalciferol em um modelo animal de depressão associado com desregulação no eixo HPA. Consequentemente, nós mostramos que o colecalciferol tem um potencial efeito tipo-antidepressivo possivelmente mediados pela atenuação da produção de EROS. Apesar do nosso estudo apresentar algumas limitações como a falta de análises de mais parâmetros para fundamentar nossos achados (como os níveis circulantes de vitamina D, verificação da ativação do sistema vitamina D-VDR no tecido cerebral, além de outros parâmetros do estado redox), nossos resultados podem fornecer novas informações bem como proposições para a compreensão dos potenciais mecanismos antidepressivos dessa vitamina, além de contribuir de forma efetiva para avanços no entendimento da fisiopatologia da depressão.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e pela Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues e o grupo de pesquisa Neurobiologia da Depressão do departamento de bioquímica do Centro de Ciência Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Referências

ALEKHYA, P. et al., 2015. Adherence to Antidepressant Therapy : Sociodemographic Factor Wise Distribution. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 7, 180–184.

ALREFAIE, Z.; ALHAYANI, A., 2015. Vitamin D improves decline in cognitive function and cholinergic transmission in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Behavioural Brain Research* 287, 156–162.

ANGLIN, R.E. et al., 2013. Vitamin D deficiency and depression in adults: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Psychiatry* 202, 100–107.

Balcombe, J.P., Barnard, N.D., Sandusky, C., 2004. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci* 43, 42–51.

BET, P.M. et al., 2013. Side effects of antidepressants during long-term use in a naturalistic setting. *European Neuropsychopharmacology* 23, 1443–1451.

BEYER, J.L.; PAYNE, M.E., 2016. Nutrition and Bipolar Depression. *Psychiatric Clinics of North America* 39, 75–86.

BROUWER-BROLSMA, E.M. et al., 2015. Low vitamin D status is associated with more depressive symptoms in Dutch older adults. *European Journal of Nutrition* 55, 1525–1534.

BUDNI J. et al., 2013. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Experimental Neurology* 240, 112–121.

CAMARGO A. et al., 2018. Cholecalciferol counteracts depressive-like behavior and oxidative stress induced by repeated corticosterone treatment in mice. *European Journal of Pharmacology* 833, 451-461.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y., 2011. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Sciences-New York* 48, 749–762.

CHEN, K.B., et al., 2003. Systemic vitamin D3 attenuated oxidative injuries in the locus coeruleus of rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 993, 313-249.

CUI, C. et al., 2017. Vitamin D Receptor Activation Influences NADPH Oxidase (NOX2) Activity and Protects against Neurological Deficits and Apoptosis in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

CURTIS, K.S. et al., 2004. Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav* 80, 657-64.

ERBAŞ, O. et al., 2014. Cholecalciferol (vitamin D 3) improves cognitive dysfunction and reduces inflammation in a rat fatty liver model of metabolic syndrome. *Life Sciences* 103, 68–72.

EYLES, D.W. et al, 2013. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* 34, 47–64.

FEDOTOVA, J. et al., 2016. Different effects of vitamin D hormone treatment on depression-like behavior in the adult ovariectomized female rats. *Biomedicine & pharmacotherapy* 84, 1865–1872.

GUPTA, D. et al., 2015 Effect of a novel 5-HT 3 receptor antagonist 4i , in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. *Steroids* 96, 95–102.

HALLGREN, M. et al., 2017. Treatment guidelines for depression: Greater emphasis on physical activity is needed. *European Psychiatry* 40, 1–3.

HAN, C. et al., 2016. The Association Between Oxidative Stress and Depressive Symptom Scores in Elderly Population : A Repeated Panel Study. *Journal of Preventive Medicine & Public Health* 49, 260–274.

HEMPEL, S. et al., 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 146–159.

IBI, M. et al., 2001. Protective effects of 1 alpha,25-(OH)(2)D(3) against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. *Neuropharmacology* 40, 761–771.

JOSEPH, J.J.; GOLDEN, S.H., 2016. Cortisol dysregulation: The bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1–15.

KALUEFF, A.V., 2002. Grooming and stress. KSF Publishers, Kiv., 148.

KALUEFF, A.V. et al., 2004. Increased grooming behavior in mice lacking vitamin D receptors. *Physiology and Behavior* 82, 405–409.

KIM, G. H. et al., 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* 24, 325–340.

KHAWAM, E.A. et al., 2006. Side effects of antidepressants: An overview. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 73, 1–9.

LIU, T. et al., 2015. A meta-analysis of oxidative stress markers in depression. *PLoS ONE* 10, 1–17.

LOWRY, O.H. et al., 1951. Protein measurement with the folinphenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–267.

MANNA, P. et al., 2017. Vitamin D supplementation inhibits oxidative stress and upregulate SIRT1/AMPK/GLUT4 cascade in high glucose-

treated 3T3L1 adipocytes and in adipose tissue of high fat diet-fed diabetic mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 615, 22-34.

MANOHARAN, S. et al., 2016. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–15.

MANOSSO, L.M. et al., 2013 Nutritional strategies for dealing with depression. *Food & function* 4, 1776–1793.

MAURYA, P.K. et al., 2016. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 65, 134–144.

MONICZEWSKI, A. et al., 2015. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacological Reports* 67, 560–568.

MORETTI, M. et al., 2012 Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of Psychiatric Research* 46, 331–340.

MORETTI, M. et al., 2013 Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. *Journal of Molecular Neuroscience* 46, 68-79.

MOZAFFARI-KHOSRAVI, H. et al., 2013 The effect of 2 different single injections of high dose of vitamin D on improving the depression in depressed patients with vitamin D deficiency: a randomized clinical trial. *Journal Of Clinical Psychopharmacology* 33, 378–385.

MPANDZOU, G. et al., 2016. Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: A review. *Revue Neurologique (Paris)*, 1–14.

MUNHOZ, T.N. et al., 2016. A nationwide population-based study of depression in Brazil. *Journal of Affective Disorders* 192, 226–233.

OLESCOWICZ, G. et al., 2017. Antidepressant and pro-neurogenic effects of agmatine in a mouse model of stress induced by chronic exposure to corticosterone. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 81, 395-407

OTTE, C. et al., 2016. Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers* 2, 1065.

PARKER, G.B. et al., 2017. Vitamin D and depression. *Journal of Affective Disorders* 208, 56-61.

ROSA, P.B. et al., 2014. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 127, 1-6.

RODRIGUES, A.L. et al., 1996. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacology and Toxicology* 79, 150-6.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M., 2012. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62, 63-77.

SANSONE, R.A.; SANSONE, L.A., 2012. Keywords antidepressant adherence : Are Patients Taking Their. *Innovations in Clinical Neuroscience* 9, 41-46.

SEPEHRMANESH, Z. et al., 2016. Vitamin D Supplementation Affects the Beck Depression Inventory, Insulin Resistance, and Biomarkers of Oxidative Stress in Patients with Major Depressive Disorder: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Journal of Nutrition* 146, 243-248.

SHIN, Y.C. et al., 2016. The associations among vitamin D deficiency, C-reactive protein, and depressive symptoms. *Journal of Psychosomatic Research* 90, 98-104.

SILVA, M.C.C. et al., 2016. Evidence for protective effect of lipoic acid and desvenlafaxine on oxidative stress in a model depression in mice.

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 64, 142–148.

SMAGA, I. et al., 2015. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. Pharmacological Reports 67, 569–580.

STERU, L. et al., 1985. The Tail Suspension Test - a New Method for Screening Antidepressants in Mice. Psychopharmacology (Berl) 85, 367-370.

TARBALI, S.; KHEZRI, S., 2016. Vitamin D3 attenuates oxidative stress and cognitive deficits in a model of toxic demyelination. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 19, 80–88.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2018a. Depression. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression> (Accessed 03 october 2018)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2018b. Mental Health Gap Action Programme (mhGAP) Intervention Guide. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250239/9789241549790-eng.pdf;jsessionid=F7475276A6CADF44441D68B715E1B4DC?sequence=1> (Accessed 03 october 2018)

WRZOSEK, M. et al., 2013. Vitamin D and the central nervous system. Pharmacological reports : PR 65, 271–278.

YALCIN, I. et al., 2008. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. Behav. Brain Res.193, 140–143.

YANG, L. et al., 2016 1,25(OH)2D3 inhibits high glucose-induced apoptosis and ROS production in human peritoneal mesothelial cells via the MAPK/P38 pathway. Molecular Medicine Reports 14, 839-844.

YAU, W. et al., 2014. Noncontinuous use of antidepressant in adults with major depressive disorders – a retrospective cohort study. *Brain and Behavior* 4, 390–397.

ZHANG, Y. et al., 2016. Effects of hydrogen-rich water on depressive-like behavior in mice. *Scientific Reports* 6:2374.

ZHAO, Y. et al., 2008. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *European Journal of Pharmacology* 581, 113–120.

ZOU, Y. et al., 2016. Apelin-13 Protects PC12 Cells from Corticosterone-Induced Apoptosis Through PI3K and ERKs Activation. *Neurochemical Research* 41, 1635-44

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados, esse trabalho mostrou que a suplementação do colecalciferol pode ter um efeito tipo-antidepressivo no TSC e atenuar a produção de EROS em camundongos submetidos à um modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona. A confirmação do efeito tipo-antidepressivo desse nutriente em um modelo que mimetiza a depressão em humanos, bem como a caracterização dos mecanismos responsáveis por esse efeito representa um avanço nessa área de estudo.

Além disso, esse trabalho torna-se importante, pois poderá fornecer bases mais sólidas para a compreensão dos potenciais mecanismos antidepressivos dessa vitamina. E como perspectivas dar a continuidade dessa pesquisa (sobre possíveis mecanismos bioquímicos do colecalciferol envolvidos na depressão) através de realizações de novos projetos, que incluam as análises de mais parâmetros para fundamentar nossos achados (como os níveis circulantes de vitamina D, verificação da ativação do sistema vitamina D-VDR no tecido cerebral, além de outros parâmetros do estado redox). E considerando o impacto social da depressão, esses estudos pode contribuir para o estabelecimento de possíveis alternativas terapêuticas que possam auxiliar no tratamento convencional para esse transtorno.

REFERÊNCIAS

ALEKHYA, P. et al. Adherence to Antidepressant Therapy: Sociodemographic Factor Wise Distribution. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research** v. 7, n. 3, p. 180–184, 2015.

AL MHEID, I. et al. Vitamin D and cardiovascular disease: Is the evidence solid? **European Heart Journal**, v. 34, n. 48, p. 3691–3698, 2013.

ALREFAIE, Z.; ALHAYANI, A. Vitamin D³ improves decline in cognitive function and cholinergic transmission in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, v. 287, p. 156–162, 2015.

American Psychiatric Association (APA): What Is Depression? 2017. Disponível em <https://psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression?_ga=1.170800800.1850014633.1485020908> Acesso em Janeiro de 2017

American Psychiatric Association (APA): Diagnostic and Statistical. Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.

ANDERSON, P. H.; MAY, B. K.; MORRIS, H. A. Vitamin D metabolism: new concepts and clinical implications. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 24, n. 1, p. 13–26, 2003.

ANGLIN, R. E. et al. Vitamin D deficiency and depression in adults: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Psychiatry**, v. 202, p. 100–107, 2013.

ANTHONY F. et al. Sex differences in the chronic mild stress model of depression. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 56, 2014.

BERNARD, K; COLÓN-EMERIC, C. Extraskelatal effects of vitamin D in older adults: Cardiovascular disease, mortality, mood, and

cognition. **American Journal Geriatric Pharmacotherapy**, v. 8, n. 1, p. 4–33, 2010.

BET, P. M. et al. Side effects of antidepressants during long-term use in a naturalistic setting. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1443–1451, 2013.

BEYER, J. L.; PAYNE, M. E. Nutrition and Bipolar Depression. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 39, n. 1, p. 75–86, 2016.

BINKLEY, N.; RAMAMURTHY, R.; KRUEGER, D. Low Vitamin D Status: Definition, Prevalence, Consequences, and Correction. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 38, n. 1, p. 45–59, 2012.

BLACK, C. N. et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–175, 2015.

BROUWER-BROLSMA, E. M. et al. Low vitamin D status is associated with more depressive symptoms in Dutch older adults. **European Journal of Nutrition.**, v. 55, n. 4, p. 1525–1534, 2015.

CARLBERG I.; MANNERVIK B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484 -490, 1985.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. **Sciences-New York**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2011.

CHANG, C., et al. Effects of antidepressant treatment on total antioxidant capacity and free radical levels in patients with major depressive disorder. **Psychiatry research**, v. 230, n. 2, p. 575–80, 2015.

CHEN, K. B.; LIN, A. M. Y.; CHIU, T. H. Systemic vitamin D3 attenuated oxidative injuries in the locus coeruleus of rat brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 993, p. 313-249, 2003.

DADHANIA, V. P. et al. Nutraceuticals against Neurodegeneration: A Mechanistic Insight. **Current neuropharmacology**, n. January, p. 627–640, 2016.

DHINGRA, D.; KUMAR, V. Evidences for the involvement of monoaminergic and GABAergic systems in antidepressant-like activity of garlic extract in mice. **Indian Journal Pharmacology**, n. 40, p.175–179, 2008.

ERBAŞ, O. et al. Cholecalciferol (vitamin D 3) improves cognitive dysfunction and reduces inflammation in a rat fatty liver model of metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 103, n. 2, p. 68–72, 2014.

EYLES, D. W.; BURNE, T. H. J.; MCGRATH, J. J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, n. 1, p. 47–64, 2013.

FEDOTOVA, J. et al. Different effects of vitamin D hormone treatment on depression-like behavior in the adult ovariectomized female rats. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 84, p. 1865–1872, 2016.

FEDOTOVA, J.; PIVINA, S.; SUSHKO, A. Effects of Chronic Vitamin D3 Hormone Administration on Anxiety-Like Behavior in Adult Female Rats after Long-Term Ovariectomy. **Nutrients**, v. 9, n. 1, p. 28, 2017.

GALESANU, C.; MOCANU, V. Vitamin D Deficiency and the Clinical Consequences. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 119, n. 2, p. 310–318, 2015.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Effect of a novel 5-HT 3 receptor antagonist 4i , in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. **Steroids**, v. 96, p. 95–102, 2015.

HAJILUIAN, G. et al. Vitamin D administration, cognitive function, BBB permeability and neuro-inflammatory factors in high-fat diet induced obese rats. **International Journal of obesity**. p. 1–29, 2017.

HALLGREN, M. et al. Treatment guidelines for depression: Greater emphasis on physical activity is needed. **European Psychiatry**, v. 40, p. 1–3, 2017.

HAN, C.; LIM, Y.; HONG, Y. The Association Between Oxidative Stress and Depressive Symptom Scores in Elderly Population: A

Repeated Panel Study. **Journal of Preventive Medicine & Public Health**, v. 49 p. 260–274, 2016.

HEMPEL, s. l.; BUETTNER, G. R.; O'MALLEY, Y. Q.; WESSELS, D. A.; FLAHERTY, D. M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 146–159, 1999.

HIROSE, A. et al. Depressive symptoms are associated with oxidative stress in middle-aged women: a cross-sectional study. **BioPsychoSocial medicine**, v. 10, p. 12, 2016.

IBI, M. et al. Protective effects of 1 alpha,25-(OH)(2)D(3) against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 6, p. 761–71, 2001.

JONE, D. P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 1-2, p. 38-53, 2006.

JOSEPH, J. J.; GOLDEN, S. H. Cortisol dysregulation: The bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. may, p. 1–15, 2016.

KALUEFF, A. V. et al. Increased grooming behavior in mice lacking vitamin D receptors. **Physiology and Behavior**, v. 82, n. 2–3, p. 405–409, 2004.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy: Use and limitations. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 1693–1705, 2014.

KHORAMINYA, N. et al. Therapeutic effects of vitamin D as adjunctive therapy to fluoxetine in patients with major depressive disorder. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 47, n. 3, p. 271–5, 2013.

KHAWAM, E. A.; LAURENCIC, G.; MALONE D. A. Side effects of antidepressants: An overview. **Cleveland clinic journal of medicine** v. 73, n. 4, p. 1–9, 2006.

LIEBERKNECHT, V. et al. Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 365–373, 2016.

LIN, A. M. Y.; CHEN, K. B.; CHAO, P. L. Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1053, p. 319–329, 2015.

LIU, T. et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in depression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-267, 1951.

LUCAS, M.; Mirzaei, F.; Pan, A.; Okereke, O. I.; Willett, W. C.; O'Reilly, E. J.; Koenen, K. Ascherio, A. Coffee, Caffeine, and Risk of Depression Among Women. **Archives of Internal Medicine**, n.171, p.1571–1578, 2011.

MANOHARAN, S. et al. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–15, 2016.

MANOSSO, L. M.; MORETTI, M.; RODRIGUES, A. L. S. Nutritional strategies for dealing with depression. **Food & function**, v. 4, p. 1776–1793, 2013.

MAURYA, P. K. et al. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 65, p. 134–144, 2016.

MELLO, A. H. et al. Effects of omega-3 on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to chronic mild stress. **Metabolic Brain Disease**, v. 29, p. 691–699, 2014.

MIRET, M. et al. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Depressive disorders and suicide: Epidemiology, risk factors, and burden.

Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 37, n. 10, p. 2372–2374, 2013.

MŁYNIĘC, K. et al. Essential elements in depression and anxiety. Part II. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 187–194, 2015.

MŁYNIĘC, K. et al. Essential elements in depression and anxiety. Part I. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 4, p. 534–544, 2014.

MONICZEWSKI, A. et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 3, p. 560–568, 2015.

MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331–340, 2012.

MORETTI, M. et al. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 46, p. 68-79, 2013.

MOY, F. M. et al. Vitamin D deficiency and depression among women from an urban community in a tropical country. **Public Health Nutrition**, n. 14, p. 1–7, 2016.

MOZAFFARI-KHOSRAVI, H. et al. The effect of 2 different single injections of high dose of vitamin D on improving the depression in depressed patients with vitamin D deficiency: a randomized clinical trial. **Journal Of Clinical Psychopharmacology**, v. 33, n. 3, p. 378–385, 2013.

MPANDZOU, G. et al. Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: A review. **Revue Neurologique (Paris)**, p. 1–14, 2016.

MUNHOZ, T. N. et al. A nationwide population-based study of depression in Brazil. **Journal of Affective Disorders**, v. 192, p. 226–233, 2016.

MUSCARITOLI, M. et al. Effectiveness and efficacy of nutritional therapy - A cochrane systematic review. **Clinical Nutrition**, 2015.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 2002.

NORMAN, A. W. The history of the discovery of vitamin d and its daughter steroid hormone. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 3, p. 199–206, 2012.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. Mdd, p. 16065, 2016.

PARKER, G. B.; BROTCHE, H.; GRAHAM, R. K. Vitamin D and depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 208, n. October 2016, p. 56–61, 2017.

PATKI, G. et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Research**. v. 1539, p. 73-86, 2013

Pham, A. et al. Green tea and coffee consumption is inversely associated with depressive symptoms in a Japanese working population. **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 625–633, 2013.

PLUDOWSKI, P. et al. Vitamin D supplementation guidelines. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 2016.

Recommended Dietary Allowances (RDA). Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended dietary allowances and adequate intakes, vitamins. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies, 2011.

ROSA, P. B. et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 1–6, 2014.

RODRIGUES, A.L. et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology and Toxicology**, v. 79, p. 150-6, 1996.

SAKAKIBARA, H.; YOSHINO, S.; KAWAI, Y.; TERAOKA, J. Antidepressant-Like Effect of Onion (*Allium cepa* L.) Powder in a Rat Behavioral Model of Depression. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, n. 72, p. 94–100, 2008.

SANSONE, R. A.; SANSONE, L. A. KEY WORDS ANTIDEPRESSANT ADHERENCE: Are Patients Taking Their. **Innovations in Clinical Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 41–46, 2012.

SARRIS, J. et al. Adjunctive nutraceuticals for depression: A systematic review and meta-analyses. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 6, p. 575–587, 2016.

SARRIS, J. Clinical use of nutraceuticals in the adjunctive treatment of depression in mood disorders. **Australasian Psychiatry**, p. 103985621668953, 2017.

SEPEHRMANESH, Z. et al. Vitamin D Supplementation Affects the Beck Depression Inventory, Insulin Resistance, and Biomarkers of Oxidative Stress in Patients with Major Depressive Disorder: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 2, p. 243–248, 2016.

SHEN, J. et al. Neuroscience Letters Berberine up-regulates the BDNF expression in hippocampus and attenuates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience Letters**, v. 614, p. 77–82, 2016.

SHIN, Y. C. et al. The associations among vitamin D deficiency, C-reactive protein, and depressive symptoms. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 90, p. 98–104, 2016.

SHYLA, C. S. et al. Protective effect of sex on chronic stress- and depressive behavior-induced vascular dysfunction in BALB/cJ mice. **J Appl Physiol**, v.117, p. 959–970, 2014.

SIEGRIST, J. et al. Depressive symptoms and psychosocial stress at work among older employees in three continents. **Globalization and health**, v. 8, n. July, p. 27, 2012.

SILVA, M. C. C. et al. Evidence for protective effect of lipoic acid and desvenlafaxine on oxidative stress in a model depression in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 64, p. 142–148, 2016.

SMAGA, I. et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 3, p. 569–580, 2015.

STERU, L. et al. The Tail Suspension Test - a New Method for Screening Antidepressants in Mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

TARBALI, S.; KHEZRI, S. Vitamin D3 attenuates oxidative stress and cognitive deficits in a model of toxic demyelination. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, n. 1, p. 80–88, 2016.

VAN DER SCHAFT, J. et al. The association between vitamin D and cognition: A systematic review. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 4, p. 1013–1023, 2013.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.77, p. 325-332, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Depression. Reviewed February 2017. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>> Acesso em 08/05/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Investing in treatment for depression and anxiety leads to fourfold return. 2016a. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/en/>> Acesso em 08/05/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mental Health Gap Action Programme (mhGAP) Intervention Guide. 2016b. Disponível em <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250239/1/9789241549790-eng.pdf?ua=1>> Acesso em 08/05/2017.

WRZOSEK, M. et al. Vitamin D and the central nervous system. **Pharmacological reports : PR**, v. 65, n. 2, p. 271–278, 2013.

YAU, W. et al. Noncontinuous use of antidepressant in adults with major depressive disorders – a retrospective cohort study. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 3, p. 390–397, 2014.

XU, Y. et al. The contribution of lifestyle factors to depressive symptoms: A cross-sectional study in Chinese college students. **Psychiatry Research**, v. 245, p. 243–249, 2016.

ZHANG, H. et al. Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal glycogen level and induces depression-like behavior in mice. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 16, n. 1, p. 62–9, 2015.

ZHANG, Y. et al. Effects of hydrogen-rich water on depressive-like behavior in mice. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

ZHAO, Y. et al. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, n. 1–2, p. 113–120, 2008.

ZOU, Y. et al. Apelin-13 Protects PC12 Cells from Corticosterone-Induced Apoptosis Through PI3K and ERKs Activation. **Neurochemical Research**, 2016.

ANEXO 1

2017-6-7

notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe9931c868325702e0075533b:b00e3cc308b6583283257a470074ae69?OpenDocument

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

FP00795

Título

Metodologias utilizadas no laboratório de Neurobiologia da Depressão para ensaios in vivo.

Data de Entrada

17/05/2012

Resultado:

Aprovado

Data / Prazo

26/07/2012

Considerações

Ofício nº 62/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues, Departamento de Bioquímica - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA-UFSC deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no protocolo e corrigidos na carta anexa estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: sete mil camundongos (*Mus musculus*) e duzentos e cinquenta ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 26/10/2016

Data 26/07/2012

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**