



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ELOISE CLEMES ALVES

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COLECALCIFEROL E CLORETO DE ZINCO  
EM UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARIDEO**

FLORIANÓPOLIS  
2023

ELOISE CLEMES ALVES

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COLECALCIFEROL E CLORETO DE ZINCO  
EM UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARIDEO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

FLORIANÓPOLIS

2023

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

Alves, Eloise Cledes  
EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COLECALCIFEROL E ZINCO EM  
UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO /  
Eloise Cledes Alves ; orientador, Ana Lúcia Servero  
Rodrigues, 2023.  
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. colecalciferol . 3. cloreto de zinco.  
4. estresse oxidativo. 5. lipopolissacarídeo, transtorno  
depressivo maior.. I. Rodrigues, Ana Lúcia Servero. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica. III. Título.

Eloise Clemes Alves

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COLECALCIFEROL E ZINCO EM UM  
MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARIDEO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Manuella Pinto Kaster  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Vivian Binder Neis  
UniSociesc

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Bioquímica

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis, 2023

*Dedico este trabalho a minha família, em especial ao meu esposo Thiago, minha filha Sophie e meu filho Théo, que não mediram esforços para que eu conseguisse chegar até aqui e realizar meu sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou e guiou o meu caminho durante esta jornada, por me dar força nos momentos que pensei em desistir, pois foram mais de 30.000km rodado entre Criciúma e Florianópolis nesses anos.

Um agradecimento especial ao meu marido Thiago Isael Teixeira Gonçalves, por estar do meu lado dando força nos momentos bons e ruins, oferecendo carinho, amor, amizade e companheirismo, e por entender a minha ausência muitas vezes, além de cuidar tão bem da nossa filha nos momentos que estava viajando, a ele meu MUITO OBRIGADA. Te amo! Outro agradecimento muito especial a minha filha amada Sophie Alves Gonçalves, que mesmo com pouca idade entendeu que a mamãe precisava se ausentar para seguir seu sonho. Te amo filha!

Agradeço a minha família em especial aos meus pais, João Batista Alves e Elaine Cledes Alves, que me deram força e coragem para seguir meu sonho, e por cuidar de minha filha no tempo que precisei ficar fora, a minha irmã Larissa Cledes Alves e meu cunhado André Passos do Canto também por cuidarem de minha filha quando precisei e por sempre estarem do meu lado, ao meu irmão João Vitor Cledes Alves por me emprestar seu carro sempre que precisei.

Agradeço ao meu afilhado Arthur Alves do Canto, a minha sobrinha Ana Júlia Passos do Canto por compreenderem que mesmo não tendo muito tempo para ficar com eles, a gente sempre dava um jeito de matar as saudades.

Não poderia deixar de agradecer a minha prima Alana Cledes Assis e meus primos Aury Marçal e Alan Assis, por me acolherem com carinho em sua casa durante o tempo que precisei.

À minha orientadora Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues, por te aceitado me orientar, além de ter me acolhido com carinho, estando sempre disposta a ajudar mediante a todas as minhas dificuldades, meu eterno agradecimento por todos os ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Neurobiologia da Depressão, em especial a Ana Paula Valverde e a Marina, que me ajudaram sempre que precisei, e por passar os perrengues junto comigo dando apoio. Agradeço também aos demais alunos do Laboratório de pelas contribuições durante este período.

Um agradecimento especial ao meu colega Jacó, por inúmeras vezes ceder seu laboratório para que pudesse realizar minhas pesquisas, além de contribuir com sua sabedoria.

Agradeço também aos professores pelos ensinamentos passados nas aulas durante esse período, foi um imenso prazer conhecê-los;

Não poderia deixar de agradecer ao LAMEB pela estrutura com o uso dos equipamentos, a CAPES pelo apoio financeiro e a UFSC pela estrutura.

Meus sinceros agradecimentos! Obrigada!

Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.  
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.  
Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.  
Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.  
Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.  
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina, pois sonhos sem disciplina  
produzem pessoas frustradas.  
Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama!  
(CURY, [S.D])



## RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é transtorno psiquiátrico complexo caracterizado por alterações de humor, distúrbios somáticos e neurovegetativos, que acomete muitas pessoas em todo o mundo, sendo um dos principais problemas de saúde pública. Possui origem multifatorial, sendo que o estresse oxidativo e a neuroinflamação estão associados com o desenvolvimento de sintomas da depressão. Os tratamentos atuais baseiam-se na modulação do sistema monoaminérgico, contudo apresentam eficácia limitada. Desta forma, tem se buscado a associação de compostos que possuem efeito antidepressivo como uma estratégia terapêutica para o TDM. A vitamina D é um hormônio com diversas funções regulatórias, contendo uma ampla quantidade de receptores no cérebro. O zinco é um oligoelemento que possui ação antioxidante, anti-inflamatória e atua também no sistema imune. Há evidências de que ambos apresentam efeito antidepressivo em estudos pré-clínicos e clínicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antidepressivo do colecalciferol e do cloreto de zinco isolados ou em combinação em um modelo animal de depressão induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Para este fim foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, submetidos à administração de colecalciferol (1000 UI/kg/dia) e/ou cloreto de zinco (10 mg/kg/dia) por 7 dias. No dia 7, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de LPS (0,5 mg/kg) e após 24 horas da execução do protocolo, foram realizados os testes comportamentais, sendo estes: Teste de Suspensão pela Cauda (TSC), Teste de Campo Aberto (TCA) e o teste de Borrifagem de sacarose (TBS), para avaliar se os tratamentos foram efetivos em prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. Além disso foram medidos os níveis de malondialdeído (MDA), tióis não protéicos (indicativo do conteúdo de glutathiona reduzida e de nitrito/nitrato (NOx, indicativo dos níveis de óxido nítrico) no córtex pré-frontal. Os animais submetidos à administração de LPS apresentaram um comportamento do tipo-depressivo, evidenciado pelo aumento significativo do tempo de imobilidade no TSC, o que foi prevenido os tratamentos com colecalciferol, zinco e associação dos compostos. Os animais desafiados com LPS apresentaram comportamento do tipo-ansioso, pois levaram mais tempo para entrar no centro e iniciar a autolimpeza, diminuíram o tempo no centro e aumentaram o tempo de autolimpeza no TCA. No TBS os animais tratados com LPS apresentaram um tempo maior para a latência em relação ao grupo controle. O colecalciferol e/ou o zinco foram efetivos em prevenir as alterações comportamentais induzidas por LPS no TSC, no TCA no parâmetro de latência para entrada no centro e no TBS. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os animais desafiados com o LPS apresentaram um aumento nos níveis de MDA e NOx e uma redução de tióis não protéicos no córtex pré-frontal, sendo que os tratamentos preveniram essas alterações. Estes resultados indicam que o colecalciferol, o zinco e associação dos compostos tem um potencial efeito tipo-antidepressivo em um modelo de depressão mediado por um desafio inflamatório, sendo que este efeito está associado com uma prevenção de alterações bioquímicas relacionadas à dano oxidativo no córtex pré-frontal.

**Palavras chaves:** cloreto de zinco, colecalciferol, estresse oxidativo, lipopolissacarídeo, transtorno depressivo maior, vitamina D.

## ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is a complex psychiatric disorder characterized by depressive mood, and somatic and neurovegetative alterations, which affects many people around the world and is one of the main public health problems. It has a multifactorial origin, and oxidative stress and neuroinflammation are associated with the development of depressive symptoms. Current treatments are based on modulating the monoaminergic system, but their effectiveness is limited. The association of compounds with antidepressant effects has therefore been sought as a therapeutic strategy for MDD. Vitamin D is a hormone with various regulatory functions and its receptors are abundant in the brain. Zinc is a trace element that has antioxidant, anti-inflammatory and immune system effects. There is evidence that both compounds have an antidepressant effect in pre-clinical and clinical studies. The aim of this study was to evaluate the antidepressant effect of vitamin D and zinc chloride alone or in combination in a model of depression induced by lipopolysaccharide (LPS). For this purpose, female Swiss mice were administered cholecalciferol (1000 IU/kg/day) and/or zinc chloride (10 mg/kg/day) for 7 days. On day 7, the animals received an intraperitoneal injection of LPS (0.5 mg/kg) and after 24 hours of the protocol, the behavioral tests were carried out: Tail suspension test, (TST) open field test (OFT) and splash test (ST), to assess whether the treatments were effective in preventing LPS-induced depressive-like behavior. In addition, levels of malondialdehyde (MDA), non-protein thiols (indicative of reduced glutathione content) and nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>, indicative of nitric oxide levels) were measured in the prefrontal cortex. The administration of LPS elicited depressive-like behavior, as evidenced by the significant increase in immobility time in the TST, which was prevented by treatment with cholecalciferol, zinc and a combination of these compounds. Mice challenged with LPS showed anxiety-like behavior when compared to the control group in the OFT, as the animals that received LPS had a higher latency to enter the center and start grooming, decreased center time and increased grooming time in the OFT. In the ST LPS-exposed mice had a longer latency time compared to the control group. Cholecalciferol and/or zinc were effective in preventing the behavioral alterations induced by LPS in the TST as well as in the latency to enter the center in the OFT and in the ST. Regarding biochemical parameters, the animals challenged with LPS showed an increase in MDA and NO<sub>x</sub> levels and a reduction in non-protein thiols, and the treatments were able to prevent these alterations. These results indicate that cholecalciferol, zinc and a combination of these compounds have a potential antidepressant-like effect in a model of depression mediated by an inflammatory challenge, and that this effect is associated with a prevention of biochemical alterations related to oxidative damage in the prefrontal cortex.

**Keywords:** zinc chloride, cholecalciferol, oxidative stress, lipopolysaccharide, major depressive disorder, vitamin D.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Critérios de diagnóstico do TDM.....	18
Figura 2: Teoria Monoaminérgica da Depressão.....	21
Figura 3: Neurotransmissão Glutamatérgica.....	23
Figura 4: Via da L-Arginina- Óxido Nítrico (NO).....	29
Figura 5: Estrutura do LPS.....	32
Figura 6: Ativação da via de sinalização por LPS que convergem para iniciar a expressão de NO.....	34
Figura 7: Síntese de vitamina D3.....	37
Figura 8: Metabolismo do zinco.....	41
Figura 9: Desenho do protocolo experimental.....	52
Figura 10: Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS no teste de suspensão pela cauda e no campo aberto.....	57
Figura 11- Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação ao comportamento do tipo ansioso no teste do campo aberto.....	59
Figura 12- Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação ao índice de autocuidado e comportamento motivacional no teste de borrifagem de sacarose.....	61
Figura 13- Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação a determinação dos níveis de TBARS.....	62
Figura 14: Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação a determinação dos níveis de Tióis Não-proteicos (GSH).....	63
Figura 15: Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação a determinação dos níveis de NOx.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - 1,25-diidroxitamina D ou calcitriol  
24,25(OH)<sub>2</sub>D-24,25 di-hidroxitamina D  
25(OH)D- 25-hidroxitamina D  
25(OH)D<sub>2</sub>- 25-hidroxi-vitamina D<sub>2</sub>  
25(OH)D<sub>3</sub> - 25-hidroxi-vitamina D ou calcidiol  
5-HT<sub>1A</sub>- receptor de Serotonina do tipo 1A  
5-HT<sub>2A</sub>- receptor de Serotonina do tipo 2A  
7-DHC- 7-dehidrocolesterol (pró-vitamina D<sub>3</sub>)  
ACh- acetilcolina  
AMPA- α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato  
BDNF- fator neurotrófico derivado do encéfalo  
Ca<sup>2+</sup>- cálcio  
CAT- catalase  
COX-2- Ciclo-oxigenase-2  
CREB- proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc  
CYP27B1- enzima 25- hidroxitamina D 1-alfa-hidroxilase  
CYP2R1- Vitamina D-25-hidroxilase  
CYP450- enzima microsomal da superfamília do citocromo P450  
DBP- proteína ligadora da vitamina D  
DNA- Ácido Desoxirribonucleico  
EAAT- Transportadores de Aminoácidos Excitatórios  
EDRF- fator de relaxamento dependente do endotélio  
eNOS ou NOS<sub>3</sub>- Óxido Nítrico Sintase Endotelial  
ERK- proteína cinase regulada por sinal extracelular  
EROs- Espécies reativas de oxigênio  
GABA- Ácido gama-aminobutírico  
GFAP- proteína glial fibrilar ácida  
GMPc- guanosina 3',5'-monofosfato cíclico  
GSH- glutationa reduzida  
GPx- glutationa peroxidase  
GSK-3β- glicogênio sintase cinase 3β  
GSs- guanilato ciclase solúvel

GTP- guanosina 5'-trifosfato  
HO-1- heme-oxigenase 1  
HPA- eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal  
IBA-1 Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado-1  
IFNR1- receptor de interferon 1  
IFNR2- receptor de interferon 2  
IFN- $\gamma$ - Interferon-gama  
iGLU- receptores de glutamato ionotrópicos  
IL-10- interleucina-10  
IL-1 $\beta$ - interleucina-1 $\beta$   
IL-6- interleucina-6  
IL-8- interleucina-8  
iNOS ou NOS2- Óxido Nítrico Sintase Induzível  
IRAK- cinase associada a receptor  
IRF-1- fator regulador do interferon 1  
ISRS- inibidor seletivo da recaptção de serotonina  
ISRSN- inibidores duplos de recaptção de serotonina e noradrenalina  
K<sup>+</sup>- potássio  
KAR- Receptor Cainato  
Kg- quilograma  
LBP- proteína sérica de ligação do LPS  
LPS- lipopolissacarídeo  
MAO- Monoamina Oxidase  
MAPK- proteína cinase ativada por mitógeno  
MDA- malondialdeído  
Mg- miligrama  
mGLU- Receptores de glutamato metabotrópicos  
ml- mililitro  
mRNAs- ácido ribonucleico mensageiro  
mTOR- proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
MyD88- fator de diferenciação miéloide 88  
NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
NF- $\kappa$ B- Fator de transcrição nuclear kappa B  
NMDA- N-metil-D-aspartato

nNOS ou NOS1- Óxido Nítrico Sintase Neuronal  
NOS- óxido nítrico sintases  
Nrf2- fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2  
O&NS- estresse oxidativo e nitrosativo  
NO- Óxido Nítrico  
PAF- fator ativador de plaquetas  
PCR- proteína C-reativa  
PI3K- fosfatidilinositol 3 cinase  
RNA- ácido ribonucleico.  
ROS- Espécies reativas de oxigênio  
SNC- Sistema Nervoso Central  
SOD- superóxido dismutase  
STAT- transdutor de sinal e ativador da transcrição  
TBARS- ácido tiobarbitúrico  
TCA- Teste do campo aberto  
TDM- Transtorno Depressivo Maior  
TLR4- receptor semelhante a Toll-like 4  
TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral- $\alpha$   
TRAF6 - receptor do fator de necrose tumoral 6  
TSC- Teste da suspensão pela cauda  
UI- unidade internacional  
UVB- radiação ultravioleta B  
VDR- receptores de vitamina D  
Zn<sup>2+</sup>- zinco  
 $\mu$ g- micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR (TDM) .....	17
<b>1.1.1 Fisiopatologia do TDM</b> .....	<b>19</b>
1.1.1.1 Teoria Monoaminérgica .....	20
1.1.1.2 Teoria Glutamatérgica .....	21
<b>1.1.2 Depressão e Estresse Oxidativo</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1.3 Óxido Nítrico (NO) e a Desregulação da Via L-Arginina- Óxido Nítrico</b> .....	<b>25</b>
1.3 PAPEL DO NO NA NEUROINFLAMAÇÃO ASSOCIADA À DEPRESSÃO .....	28
1.4 MODELO INFLAMATÓRIO DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSARÍDEO (LPS) .....	31
1.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO .....	33
1.6 ANSIEDADE .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
1.7 VITAMINA D .....	34
1.8 ZINCO .....	39
1.9 ASSOCIAÇÃO DA VITAMINA D E ZINCO .....	44
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>46</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO .....	49
4.2 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS .....	49
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	50
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	51
<b>4.4.1 Teste de Suspensão Pela Cauda (TSC)</b> .....	<b>51</b>
<b>4.4.2 Teste do Campo Aberto (TCA)</b> .....	<b>52</b>
<b>4.4.3 Teste de Borrifagem de Sacarose (TBS)</b> .....	<b>52</b>
<b>4.5 Avaliação Bioquímica</b> .....	<b>53</b>
<b>4.5.1 Homogenato de Córtex Cerebral</b> .....	<b>53</b>
<b>4.5.2 Detecção de Malondialdeído, Produto de Peroxidação Lipídica (TBARS)</b> .....	<b>53</b>

<b>4.5.3 Determinação dos Níveis de Tióis Não-Proteicos (Glutathiona Reduzida-GSH) .....</b>	<b>54</b>
<b>4.5.4 Determinação dos Níveis De NOx.....</b>	<b>54</b>
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	54
4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
5.1 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA E NO CAMPO ABERTO.....	56
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO EM RELAÇÃO AO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	58
5.3 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NO TESTE DE BORRIFAGEM DE SACAROSE.....	60
5.4 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TBARS .....	62
5.5 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TIÓIS NÃO-PROTEICOS (GLUTATIONA-REDUZIDA- GSH).....	63
5.6 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NOS NÍVEIS DE NOX .....	64
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR (TDM)

O transtorno depressivo maior (TDM) ou depressão é descrito como um transtorno psiquiátrico complexo caracterizado por sintomas tais como humor deprimido, perda de interesse, anedonia, sentimento de culpa, distúrbios do sono ou do apetite, capacidade reduzida de concentração, baixa energia e deficiências cognitivas, que precisam ser identificadas e tratadas (Canale, Furlan, 2006; World Health Organization, 2017). Assim, os indivíduos que sofrem deste transtorno têm como característica principal a melancolia e/ou anedonia, ou seja, a perda de interesse por todas, ou quase todas, as atividades que antes davam prazer, por, pelo menos, duas semanas consecutivas (American Psychiatric Association, 2015).

Este transtorno apresenta seis classificações, sendo três delas caracterizadas por sintomas específicos e as outras três caracterizadas conforme a sua etiologia. As primeiras citadas compreendem o TDM (muitas vezes chamada “depressão maior”), o Transtorno Depressivo Persistente (distímia) e o Transtorno Depressivo Específico ou Inespecífico, sendo o mais prevalente e estudado o TDM, que para ser diagnosticado deve apresentar no mínimo cinco, dentre os seguintes sintomas (figura 1): 1) humor deprimido na maior parte do dia, 2) diminuição do interesse ou prazer, 3) perda ou ganho de peso (>5% de alteração em um mês), 4) insônia ou hipersônia, 5) agitação ou retardo psicomotor, 6) fadiga ou perda de energia, 7) sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, 8) capacidade diminuída para concentrar-se ou pensar e 9) pensamentos recorrentes de morte ou suicídio (American Psychiatric Association, 2015). Para o diagnóstico do TDM necessariamente um dos dois primeiros sintomas citados deve estar presente (Coryell, Winokur 2019).

Figura 1: Critérios de diagnóstico do TDM



Para se ter o diagnóstico de TDM o paciente deve ter pelo menos cinco dos nove sintomas mostrados na figura acima, os quais devem estar presentes por pelo menos duas semanas, e que um deles seja, obrigatoriamente, humor deprimido ou perda de interesse/prazer (American Psychiatric Association, 2015). Fonte: Da Autora, 2023; adaptado do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5).

De fato, a depressão é um transtorno mental muito comum, podendo ser decorrente de causas multifatoriais, associadas à disfunção de neurotransmissores, dentre eles a dopamina, noradrenalina e serotonina, condições genéticas e ambientais (Gonçalves; Fagulha, 2004; Oliveira, Araújo, 2019). Além disso, pode-se dizer que esta condição clínica não afeta somente o indivíduo acometido, mas também traz impacto para toda a família, além de alterar o desempenho no trabalho e gerar um alto custo para a sociedade, sendo considerada um dos principais problemas de saúde pública (Barbosa et al., 2017). De acordo com o Associação Americana de Psiquiatria, o TDM possui uma complexidade ainda maior quando ocorre concomitantemente a outros transtornos psiquiátricos (como transtornos de ansiedade, por exemplo), ocasionando um alto impacto na sua evolução, o que resulta em sintomas e prejuízos funcionais mais graves, recuperação tardia, aumento de risco de recaídas, incapacidade e tentativa de suicídio (American Psychiatric Association, 2015). Outro dado relevante é o publicado pela Organização Mundial da Saúde em 2017, que indica que o TDM ocorre com mais frequência em indivíduos do sexo

feminino na proporção de 2:1 (World Health Organization, 2017). Segundo Douma et al (2005), do ponto de vista biológico, a prevalência em mulheres pode ser decorrente as alterações hormonais principalmente do estrogênio, sendo que a mudança nos níveis deste hormônio afeta os sistemas dos neurotransmissores, como os níveis de noradrenalina, serotonina, dopamina e acetilcolina. Portanto, os baixos níveis de estrogênio e conseqüentemente o de neurotransmissores (como a serotonina), podem induzir a depressão, pois este hormônio afeta o sistema serotoninérgico de várias maneiras, como o aumento da taxa de degradação da serotonina pela monoamina oxidase (a enzima que cataboliza a serotonina) e afeta o transporte intraneuronal dessa monoamina.

Estima-se que cerca de 322 milhões de pessoas no mundo sofrem de TDM, com prevalência média anual de 4,4% na população geral. O Brasil é o segundo país mais afetado pela depressão, cerca de 11.548,577 milhões dos brasileiros são acometidos por este transtorno anualmente, sendo as mulheres as mais acometidas. Embora a ausência de informação direta sobre a prevalência da depressão em muitos países dificulte a realização de um panorama mundial preciso, dados epidemiológicos mostram uma grande variabilidade nas taxas de prevalência: de 2.2% no Japão a 11,5% no Brasil com a maior prevalência da América Latina e a segunda maior do continente americano, ficando atrás dos Estados Unidos (Bromet et al., 2011; World Health Organization, 2017).

### **1.1.1 Fisiopatologia Do TDM**

O TDM é considerado um transtorno multifatorial que depende da interação de vários fatores biológicos e genéticos (Otte et al., 2016). Teorias foram formuladas para explicar as causas da depressão, envolvendo os mecanismos fisiopatológicos referentes a alterações dos níveis de neurotransmissores, como a desregulação dos neurotransmissores colinérgicos, catecolaminérgicos (noradrenérgicos e dopaminérgicos) glutamatérgicos e serotoninérgicos (5-hidroxitriptamina), a predisposição genética e a influência de fatores ambientais, a desregulação da via do óxido nítrico (NO) e o aumento de citocinas pró-inflamatórias (Chopra, Kumar & Kuhad, 2011; Kern, et al., 2012; Ghasemi, et al. 2017).

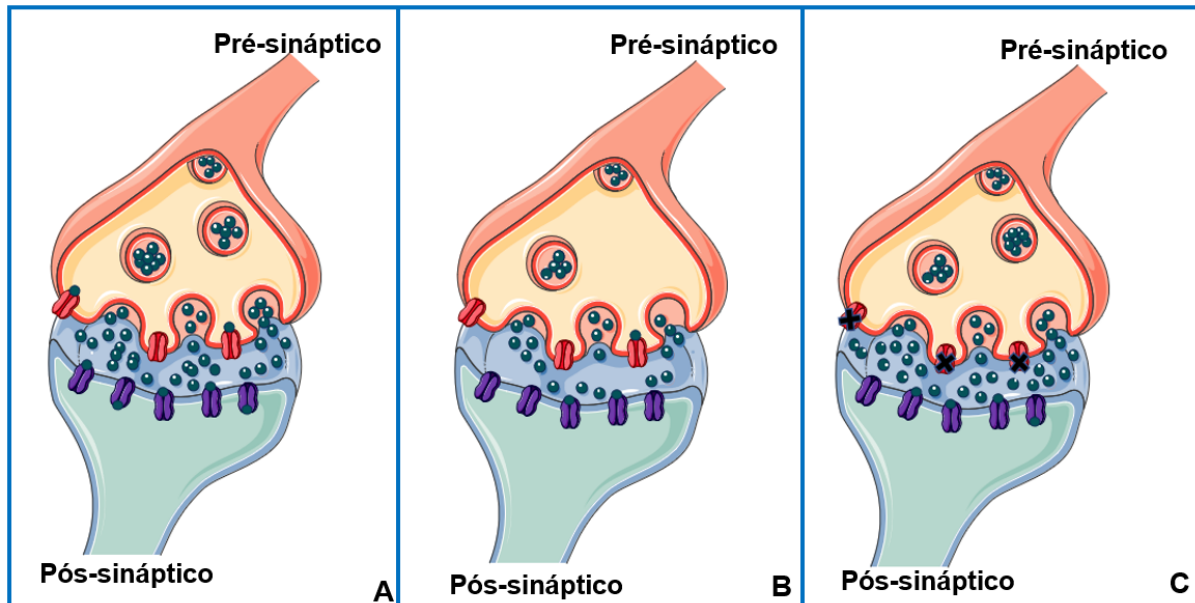
### 1.1.1.1 Teoria Monoaminérgica

A primeira e mais antiga teoria postulada para explicar o TDM é a hipótese monoaminérgica, através da qual a maioria dos mecanismos de ação de antidepressivos são respaldados. Essa teoria propõe que déficits no conteúdo cerebral de monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina) na fenda sináptica seriam responsáveis pelo desenvolvimento de sintomas depressivos (figura 2). O papel das monoaminas na fisiopatologia do TDM surgiu após a observação de que a reserpina, uma droga anti-hipertensiva que promove a depleção de norepinefrina, causava sintomas depressivos como efeito colateral (Freis, 1954; Schildkraut, 1965; Andrews, 2015). Tal hipótese foi reforçada com a descoberta dos primeiros fármacos com efeitos antidepressivos, a imipramina, descoberta durante a pesquisa de novos compostos anti-histamínicos e a iproniazida, utilizada no tratamento da tuberculose (Delay, Laine e Buisson, 1952; Kuhn, 1958; Pereira; Hiroaki-Sato, 2018).

Segundo Kuhn (1958), em 1957, foi comprovado pela primeira vez que um dos mecanismos de ação da imipramina é inibir a recaptação de serotonina e norepinefrina. Nesse sentido, a imipramina configura-se como o primeiro antidepressivo descoberto, classificado como um antidepressivo tricíclico (TCA) (Hamon; Blier, 2013). No mesmo ano, descobriu-se que a iproniazida era eficaz em produzir efeitos antidepressivos porque seu mecanismo de ação é a inibição da monoamina oxidase (MAO), enzima responsável pela degradação das monoaminas serotonina, norepinefrina e dopamina (Crane, 1957; López-Muñoz; Alamo, 2009; Hamon; Blier, 2013). Porém, a eficácia desses medicamentos não atinge 100% dos pacientes com TDM. Além disso, promovem o aumento imediato dessas monoaminas, porém seu efeito terapêutico ocorre somente algumas semanas depois da sua administração (Krishnan, Nestler, 2008; Ruhé, Mason, Schene, 2007).

Portanto, o aumento dessas monoaminas antecede a remissão dos sintomas da depressão. Embora esta teoria apresente esta limitação, continua sendo a principal base teórica a sustentar a ação dos antidepressivos disponíveis, os quais foram desenvolvidos para aumentar a transmissão das monoaminas (Willner, Scheel-Krüger, Belzung, 2013).

Figura 2: Teoria Monoaminérgica da Depressão



Teoria monoaminérgica da depressão: (A) No cérebro em indivíduo sem diagnóstico de depressão, as monoaminas (em verde) são liberadas na fenda sináptica ativando os receptores pós-sinápticos, essa neurotransmissão é terminada quando ocorre a recaptação do neurotransmissor no neurônio pré-sináptico. (B) Em um quadro de depressão, ocorre a diminuição da quantidade de monoaminas na fenda sináptica, acarretando o transtorno de humor. (C) O tratamento com inibidores da recaptação de monoaminas (em verde) aumenta a quantidade de monoaminas na fenda sináptica, ativando os receptores pós-sinápticos e possibilitando uma reversão dos sintomas de depressão. Fonte: Da Autora, 2023

### 1.1.1.2 Teoria Glutamatérgica

A hipótese glutamatérgica postula que no TDM ocorre uma estimulação excessiva do sistema glutamatérgico, causando excitotoxicidade. O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos. É liberado dos neurônios pré-sinápticos, podendo interagir com os receptores de glutamato pós-sinápticos. Tem como funções a proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência neuronal, bem como a formação e maturação de sinapses (Hashimoto, 2009; Tomasetti et al., 2019; Sanacora; Treccani; Popoli, 2012). Portanto o sistema glutamatérgico é essencial para muitos processos, incluindo a regulação do humor, aprendizagem e memória (Hillhouse; Porter, 2015).

O glutamato é sintetizado nos neurônios pré-sinápticos pela enzima glutaminase, a qual promove a desaminação da glutamina. Contudo o glutamato também pode sintetizado a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato, através de uma reação catalisada pela enzima glutamato-desidrogenase. Posteriormente, o glutamato é armazenado nas vesículas sinápticas através dos transportadores vesiculares de glutamato,

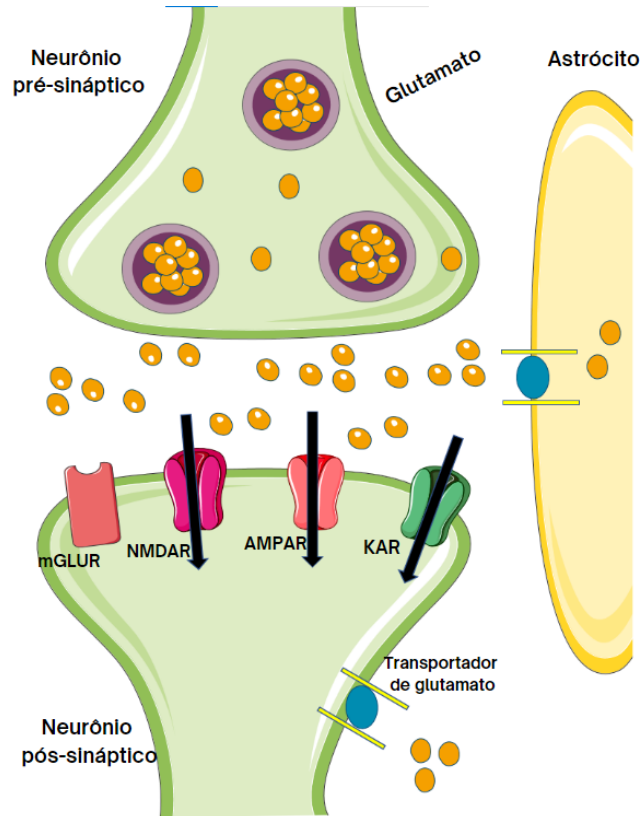
podendo ser liberado por exocitose, de maneira dependente de potencial de ação (Zhou; Danbolt, 2014; Niciu; Kelmendi; Sanacora, 2012). Desta maneira, o glutamato liberado na fenda sináptica pode interagir com receptores de membrana que se dividem em dois grupos: os receptores de glutamato ionotrópicos (iGLU),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato), que quando são ativados permitem a entrada de íons catiônicos (íons de cálcio e sódio) para o interior do neurônio pós-sináptico e os receptores metabotrópicos (mGLU) que incluem os receptores glutamatérgicos acoplados à proteína G estimulatória ou inibitória (figura 3) (Karakas, Regan e Furukawa, 2015; Reiner; Levitz, 2018).

Após sua liberação na fenda sináptica o glutamato pode ser captado por transportadores de aminoácido do tipo 1 e 2 (EAAT1 e EAAT2) que estão presentes nos astrócitos (Hackett e Ueda, 2015; Armada-Moreira et al., 2020). Para que a glutamina seja utilizada pelos neurônios novamente vai depender do efluxo desse aminoácido dos astrócitos para o meio extracelular, e subsequente o influxo para o interior do neurônio (Armada-Moreira et al., 2020). Logo em seguida a glutamina no interior dos neurônios é convertida em glutamato através da enzima glutaminase, e o glutamato é estocado nas vesículas sinápticas (Niciu; Kelmendi; Sanacora, 2012; Hillhouse e Porter, 2015). Após a liberação de glutamato e sua interação com receptores pós-sinápticos, este é recaptado principalmente por astrócitos, o que é importante para as sinapses, pois o excesso de glutamato pode levar à toxicidade e morte neural (excitotoxicidade glutamatérgica) (Popoli et al., 2011). Isso ocorre quando há elevado influxo de cálcio pelos receptores que compõem o sistema, em destaque para os receptores de NMDA (Murrough; Abdallah; Mathew, 2017). O excesso de glutamato na fenda sináptica pode propiciar muitos eventos que diminuem a viabilidade celular, como um grande influxo de íons cálcio, a liberação de óxido nítrico, o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e ativação de proteases (caspases) e cinases (Lau e Tymianski, 2010).

De fato, o glutamato está envolvido na neurogênese, na sinaptogênese e na sobrevivência neuronal do cérebro de mamíferos adultos, e na resposta ao estresse. Quando em condições de estresse metabólico e/ou oxidativo, pode ocorrer um aumento na liberação de glutamato e a ativação excessiva dos seus receptores. Deste modo a disfunção no sistema glutamatérgico compromete a neurogênese e a sinaptogênese devido à excitotoxicidade, conseqüentemente ocorre a atrofia

neuronal. Essas alterações neuroquímicas associadas à excitotoxicidade glutamatergica estão envolvidas na neurobiologia da depressão (Hashimoto, 2009; Thompson, 2015).

Figura 3: Neurotransmissão Glutamatergica



O glutamato é liberado na fenda sináptica e liga-se em receptores metabotrópicos (mGLUR) ou ionotrópicos (NMDA, AMPA ou cainato) no neurônio pós-sináptico. A ação desse neurotransmissor termina quando sua concentração na fenda sináptica é diminuída por captação pelos transportadores presentes nas células gliais e nos neurônios pré e pós-sinápticos. Abreviaturas: AMPAR, receptor alfa-amino-3- hidroxil-metil-5-4-isoxazolpropionico; KAR, receptor cainato; NMDAR, receptor N-metil-D-aspartato; mGLUR, receptores glutamatergicos metabotrópicos. Fonte: Da Autora, 2023 adaptado de Neis, 2017.

### 1.1.2 Depressão e Estresse Oxidativo

O equilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes no organismo é importante para manutenção da homeostase. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs), e a habilidade da célula de se defender contra esses compostos. Os EROS/ERNs são geralmente formados durante o transporte de elétrons e algumas reações enzimáticas, auto-oxidação de algumas moléculas, resultando no perfil pró-oxidante prejudicial ao organismo, levando a danos no DNA, oxidação de lipídios e proteínas

e até a morte celular (Sies, 2015; Halliwell & Gutteridge, 2007; Circu; Aw, 2010; Black et al., 2015; Maurya et al., 2016; Yang; Chen; Shi, 2019). As principais EROs são: o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e as principais ERNs são o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO) (Aprioku, 2013).

Os radicais livres são produtos decorrente do desequilíbrio redox endógeno, que podem causar o estresse oxidativo. As ERO podem causar a oxidação de lipídios de membrana, ou seja, a lipoperoxidação, causando a disfunção e destruição das membranas celulares. O grau de peroxidação dos fosfolipídios pode ser determinado pelas concentrações de malondialdeído (MDA) através do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Martinc; Grabnar; Vovk, 2014). Estudos têm evidenciado o aumento dos níveis de MDA em pacientes com depressão crônica, após um único episódio de depressão e até mesmo em pacientes com transtorno bipolar durante a fase da depressão (Andreazza, et al., 2008; Rybka et al., 2013).

Os EROS e ERNs também estão envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes para o nosso organismo (Anschau; Iaguer, 2011). Deste modo, a produção excessiva de EROS/ERNs ou a diminuição de atividade antioxidante podem contribuir para diversas patologias que acometem o sistema nervoso central (SNC), como: TDM, transtornos de ansiedade, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, autismo e epilepsias (Smaga et al., 2015; Liguori et al., 2018). Isso ocorre porque o SNC é muito sensível ao estresse oxidativo, pois possui um elevado teor de lipídios e uma alta demanda no consumo de oxigênio (Moniczewski et al., 2015). Os danos no organismo em condições de estresse oxidativo são muitos, um deles é a indução de respostas inflamatórias (Zhang; Rong; Li, 2019). Para manter os níveis adequados na produção de radicais livres, existem os sistemas de defesa endógeno envolvendo enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos no cérebro (Mazzetti et al., 2015).

Os antioxidantes podem neutralizar os radicais livres produzidos pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, evitando os efeitos tóxicos. Existem muitas substâncias naturais que possuem como função a atividade antioxidante, como a vitamina D3 e o zinco provenientes de fonte exógena, esses são utilizados para diminuir ou neutralizar os radicais livres. As principais enzimas antioxidantes do organismo são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutational



peroxidase (GPx). A glutationa (GSH), vitamina A, vitamina E, vitamina D e zinco são alguns compostos que fazem parte da defesa antioxidante não enzimática, neutralizando os radicais livres, protegendo o organismo dos agentes oxidantes maléficos (Martins et al., 2021; Bianchi; Antunes, 1999; Tiwari, 2011).

A glutationa é um tripeptídeo formado pelos aminiácidos glutamato, cisteína e glicina ( $\gamma$ glutamil-cisteinil-glicina), estando presente no organismo na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A concentração total de GSH no cérebro é aproximadamente 2 mM, sendo que a maior parte está na forma reduzida e apenas algo em torno de 1 % está na forma oxidada (Cooper et al., 1980). A GSH tem um importante papel no processo de defesa antioxidante celular, atuando na detoxificação de EROs, uma vez que a GSH reage de forma não-enzimática com EROs e também atua como um doador de elétrons para reduzir os peróxidos na reação catalisada pela GPx (Martinc; Grabnar; Vovk, 2014; Bates, 2023). A GSH tem sido um dos antioxidantes mais estudados nos transtornos depressivos, pois alguns estudos clínicos mostraram que mulheres com depressão apresentavam níveis diminuídos de GSH no sangue e aumento da atividade da GPx quando comparadas com mulheres sem a doença (Kodydková, et al., 2009, Ozca, et al., 2004). Além disso, a administração de GSH produz efeito tipo antidepressivo em camundongos (Rosa et al, 2013; Dafré et al., 2020).

Muitos estudos têm mostrado a relação entre a inflamação e o estresse oxidativo no TDM, isso porque em estado de estresse oxidativo excessivo ocorre a ativação dos macrófagos do sistema nervoso central, ativação da micróglia e a disfunção do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), aumenta o cortisol, prejudicando a plasticidade sináptica (Casseb, et al., 2019; Price, et al., 2018). Portanto no TDM ocorre a liberação de citocinas inflamatórias que desencadeiam alterações comportamentais, neuroendórinas e neuroquímicas (Lindqvist, et al., 2107; Maes, 1999; Schiepers, et al., 2005).

### **1.1.3 Óxido Nítrico (NO) e a Desregulação da Via L-Arginina-Óxido Nitrico**

Descoberto por Jan B. Helmont no século XVII, e por muitos anos estudado por Joseph Priestley, o Óxido Nítrico (NO) foi considerado um poluente (Chatkin, 2000). Inicialmente, seu envolvimento no organismo humano, foi descrito pela primeira vez pois o endotélio da aorta liberava substâncias que intervinham para a dilatação

produzida pela acetilcolina (ACh), essa substância foi chamada de relaxamento dependente do endotélio (EDRF), posteriormente chamada de NO (Furchgott; Zawadzki, 1980; Epstein; Moncada; Higgs, 1993).

O NO foi classificado como um radical livre e gasoso na temperatura ambiente, inorgânico, incolor, com cinco elétrons no nitrogênio e seis no oxigênio, sendo um desses elétrons desemparelhado, altamente reativo devido à presença de radical livre. O NO tem uma meia vida curta, sendo convertido a nitrito e nitrato (Bredt, Snyder, 1992).

Já na década de 80 apareceram os primeiros relatos destacando compostos de óxidos nitrogenados como produtos do metabolismo dos mamíferos, ressaltando a importância na descoberta do NO produzido endogenamente (Ignarro, 1989; Palmer; Ferrige; Moncada, 1987). Com o passar dos anos os estudos com essa molécula se amplificaram evidenciando a produção de NO após a ativação dos receptores NMDA em neurônios (Garthwaite et al., 1989).

O NO desempenha um papel importante como neuromodulador no SNC, pois possui a capacidade de difusão livre através das membranas celulares e, diferentemente da maior parte dos neurotransmissores, não é armazenado nas vesículas sinápticas e, portanto, não é liberado por processo de exocitose (Esplugues, 2002; Dhir & Kulkarni, 2011; Lind et al., 2017; Ghasemi; Claunch; Niu, 2019). Por outro lado, o excesso de NO no cérebro prejudica a neurotransmissão, plasticidade sináptica, regulação da expressão gênica, modulação de comportamentos sexuais e agressivos, aprendizagem e percepção da dor (Garthwaite, 2019). Dessa forma a desregulação da via L-arginina-óxido nítrico pode estar envolvida na fisiopatologia de muitos transtornos neuropsiquiátricos tais como: esquizofrenia, transtornos de ansiedade e TDM (Lind et al., 2017). Contudo a função do NO na fisiopatologia do TDM foi sugerida após o uso de paroxetina, inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), que é capaz de atuar como inibidora da NOS (Finkel et al., 1996). Outros estudos clínicos e pré-clínicos evidenciaram a relação do NO no TDM. Um estudo de Lee e colaboradores (2006) relatou que pacientes com depressão apresentavam um aumento na produção de NO. Já nos estudos pré-clínicos em modelos animais de depressão, substâncias capazes de inibir a NOS ou a guanilato ciclase solúvel promovem efeitos tipo-antidepressivos (Yildiz et al., 2000; Harkin et al., 2003; Kaster et al., 2005).

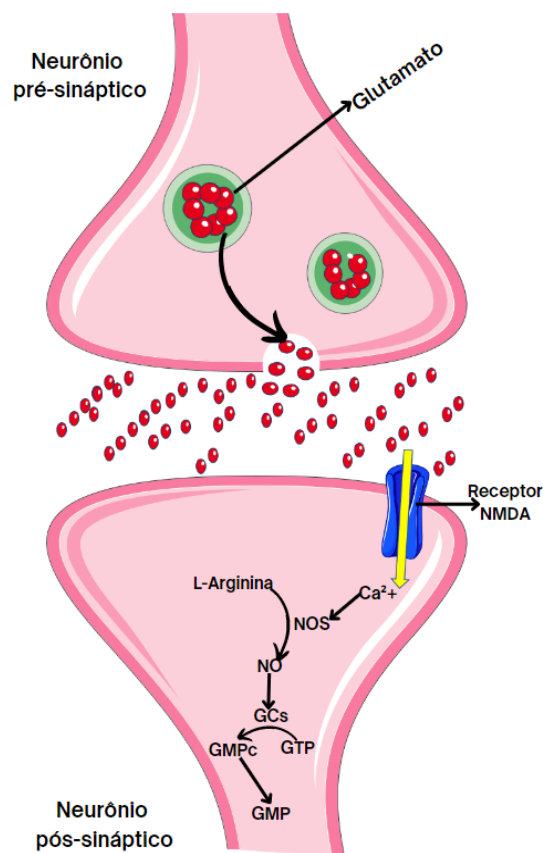
O NO é sintetizado por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), sendo estas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . A NOS utiliza a L-arginina como substrato, convertendo-a em NO e L-citrulina (Guix et al., 2005). Um dos alvos intracelulares do NO é a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (figura 4) (Moncada, 1994; Ghasemi; Claunch; Niu, 2019). Existem três isoformas de NOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS ou NOS1), Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS ou NOS2) e Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS ou NOS3), sendo essas relacionadas com o desenvolvimento e diferenciação dos tecidos neuronais, angiogênese e resposta inflamatória (Knowles; Moncada, 1994).

A síntese do NO também está envolvida na morte neuronal induzida por glutamato (Strijbos, Leach, Garthwaite, 1996; Ghasemi; Claunch; Niu, 2019), sendo relacionada ao estresse oxidativo em condições patológicas como isquemia e doenças neurodegenerativas (Guix et al., 2005; Shahani e Sawa, 2012). Portanto o aumento nos níveis de GMPc ocasionado pela estimulação da enzima GCs (mediada por NO) modula a atividade de alvos intracelulares como as proteínas cinases dependentes de GMPc (PKG) assim como canais iônicos, levando a uma alteração na excitabilidade neural e propagação de sinal pelo SNC através da abertura de canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) e consequente hiperpolarização da membrana plasmática do neurônio (Garthwaite e Boulton, 1995; Mackinnon, 2003; Ghasemi; Claunch; Niu, 2019).

Das três isoformas, a iNOS é a isoenzima envolvida em processos inflamatórios, levando a um aumento de NO, o qual participa de diversos mecanismos de sinalização intracelular e na formação de espécies reativas durante o estresse oxidativo (Leonard et al., 1998). Contudo a iNOS é uma enzima independente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina que geralmente não é expressa em condições basais (Guix et al., 2005; Ghasemi; Claunch; Niu, 2019), sua expressão é regulada após a síntese de estímulos imunológicos ou inflamatórios, como citocinas e endotoxinas bacterianas (por exemplo, lipopolissacarídeo) (Lyons et al., 1992; Ghasemi & Fatemi, 2014). Uma vez que a expressão de iNOS é regulada principalmente por estímulos imunológicos ou inflamatórios, a síntese de NO mediada por iNOS também pode ser importante para a fisiopatologia do TDM. Consistente com esta hipótese, a exposição ao estresse aumenta a expressão de iNOS no cérebro, e o tratamento sistêmico com aminoguanidina, um inibidor preferencial de iNOS, pode reduzir as consequências

comportamentais do estresse (Madrigal et al., 2001; Olivenza et al., 2000; Gilhota e Dhingra, 2009; Ghasemi & Fatemi, 2014; Ghasemi; Claunch; Niu, 2019). Também foi relatado em um modelo de depressão induzida pelo estresse crônico leve, a administração de aminoguanidina intra-hipocampal induziu um efeito antidepressivo (Wang, An, Zhang, 2008). Além disso, estudos em humanos indicam que polimorfismos no gene que codifica iNOS podem ser um fator de risco para o desenvolvimento de depressão (Galecki et al., 2010).

Figura 4: Via da L-Arginina-NO



A L-Arginina é usada como substrato para a NOS formar NO e L-Citrulina. O NO possui vários alvos intracelulares e um deles é a ação sobre a guanilato ciclase solúvel (GCs). A desregulação dessa via se dá pelo aumento nos níveis de guanosina 3'-5' monofosfato cíclico (GMPc) ocasionado pela estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel mediada por NO, levando a uma alteração na excitabilidade neuronal. Fonte: Da Autora, 2023 adaptado de BERTON & NESTLER, 2006.

### 1.3 PAPEL DO NO NA NEUROINFLAMAÇÃO ASSOCIADA À DEPRESSÃO

O sistema imunológico desempenha um papel importante na manutenção da homeostase e na resposta a infecções e lesões. Embora alguns estímulos inflamatórios produzam efeitos benéficos como fagocitose, apoptose, inflamação e

reparação tecidual, a inflamação crônica pode levar à produção de fatores neurotóxicos que podem exacerbar outras comorbidades (Byrne; Whittle; Allen, 2016; Corps; Roth; McGavern, 2015; Miller; Raison, 2015)

A neuroinflamação é caracterizada por um processo inflamatório no SNC, que gera um desequilíbrio no sistema imune, levando a alterações bioquímicas, cognitivas e estruturais associadas com o desenvolvimento do TDM, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esquizofrenia, transtorno bipolar, autismo, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (Young; Bruno; Pomara, 2014; Heppner; Ransohoff; Becher, 2015; Joshi; Singh, 2018). Nestas doenças ocorre um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias: interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas e EROs/ERNs (Miller, Maletic; Raison, 2009; Uint et al., 2019).

As citocinas pró-inflamatórias podem induzir o TDM por vários mecanismos. O primeiro mecanismo está relacionado com a desregulação do eixo HPA e as citocinas pró-inflamatórias promovem a ativação desse eixo (Kenis e Maes, 2002; O'brien, Scott, Dinan, 2004). O segundo mecanismo está associado as citocinas pró-inflamatórias que modulam a neurogênese hipocampal (Malberg et al., 2000). Portanto essas citocinas podem inibir a neurogênese hipocampal (Marsland et al., 2008; Campbell et al., 2004). Também foi proposto que a neuroinflamação pode ser decorrente da ativação das vias de estresse oxidativo e nitrosativo (Maes, 2008), acompanhada por neurodegeneração e diminuição da neurogênese, ocasionando a progressão dos sintomas de depressão (Zunszain; Hepgul; Pariante, 2013; Gardner; Boles, 2011; Maes, 2011).

Embora o NO possa desempenhar um papel fundamental no cérebro, como a neuromodulação e neurotransmissão, sua super-expressão no estresse também participa de processos patológicos, como neurodegeneração e neuroinflamação em disfunções cerebrais e transtornos psiquiátricos como o TDM e transtornos de ansiedade (Chao, et al 1996, Oliveira, et al, 2016, Liu et al, 2017). Diante disso, a iNOS é expressa em uma variedade de tipos de células, sendo induzida em astrócitos e micróglia em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e componentes de patógenos, como o LPS (Murphy, 2014). Uma vez expresso, a iNOS produz níveis elevados de NO, o qual pode reagir com o superóxido e formar peroxinitrito e em certas condições promover morte neuronal através dos mecanismos que incluem a inibição da respiração mitocondrial e a liberação de glutamato dos

neurônios e da glia, resultando em excitotoxicidade (Bal-Price, Brown, 2001, Beheshti, et al., 2020). A atividade da iNOS durante uma resposta inflamatória é predominantemente regulada no nível transcricional, pós-transcricional e pós-tradução (Kinugawa, et al., 1997; Park, Murphy, 1996). Os vários fatores de transcrição, incluindo NF- $\kappa$ B, IRF-1, Stat-1 $\alpha$  e Oct-1, induzidos ou ativados por LPS e citocinas, agem sobre o promotor do gene iNOS para ativar sua transcrição (Epstein, Parrillo, 1993). Em um estudo no qual os comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso foram induzidos por LPS, a citocina IL-10 (citocina antiinflamatória) estimulou a função dos macrófagos e os estimulou a diminuir os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$ , além de evitar a produção de espécies reativas de oxigênio e a produção de NO, o que indica que estes compostos estão associados com resposta ao tratamento antidepressivo (Cunha, Moncada, Liew, 1992).

Evidências sugerem que a inibição da iNOS pode amenizar o dano oxidativo e a inflamação (Tabrizian, et al. 2016). Portanto diante desse fato o comportamento do tipo-depressivo induzido por LPS e acompanhado de dano oxidativo e neuroinflamação dos tecidos cerebrais, pode estar associado a uma super-expressão de NO decorrente de um aumento da atividade da iNOS (Beheshti, et al, 2020). Corroborando esse achado, um estudo relatou que quando administrado aminoguanidina houve a diminuição do nitrito nos tecidos corticais, o que indica que a iNOS tem um efeito mediador no dano oxidativo do tecido cerebral acompanhado por comportamentos de depressão e ansiedade induzidos por LPS (Beheshti, et al, 2020).

Além de um aumento de NO estar envolvido na neuroinflamação, pode ocorrer o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias, a ativação de células da glia e a invasão de leucócitos (Glass et al., 2010). O processo inflamatório no SNC envolve a micróglia ativada e os astrócitos servindo como fonte e alvo dos mediadores pró-inflamatórios (Machado, et al, 2020). Como resposta inflamatória para a desregulação que afeta o SNC a micróglia ativada e os astrócitos são a fonte dos mediadores inflamatórios que geram radicais livres, danificando os alvos neuronais, aumentando as citocinas pró-inflamatórias, especialmente no hipocampo (NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) (Liu & Hong, 2003; Krause & Müller, 2010; Czapski, Gajkowska, Strosznajder., 2010).

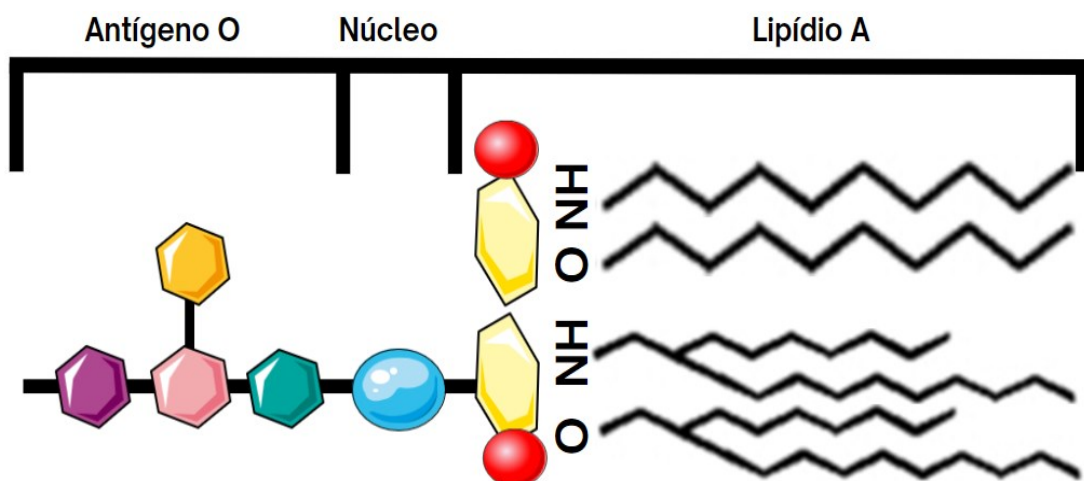
No cérebro, a ativação das vias inflamatórias contribui para a liberação de glutamato, para a redução da sua recaptção e redução do suporte neurotrófico e

também para o estresse oxidativo, sendo que estas alterações levam a um aumento da excitotoxicidade e perda de elementos gliais (Maes 2008; Quevedo; et al, 2019).

#### 1.4 MODELO INFLAMATÓRIO DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSARÍDEO (LPS)

O lipopolissacarídeo é a endotoxina presente na parede das bactérias Gram-negativas, envolvido na maioria dos fenômenos fisiopatológicos relacionados às infecções por essas bactérias (Tuin et al., 2006, Bilbo & Schwarz, 2012). Quimicamente, o LPS se divide em três estruturas: o antígeno O, que é chamado assim porque é um receptor de reconhecimento para o hospedeiro ou para a resposta imunitária humana, sendo constituído por uma sequência repetitiva de glicanos, o núcleo composto por um oligossacarídeo e por fim o lipídio A, sendo esta molécula responsável pela aderência do LPS à parede celular e pelos efeitos tóxicos e inflamatórios (figura 5) (Steimle; Autenrieth; Frick, 2016). Considerado o principal fator de virulência das bactérias gram-negativas, o LPS determina efeitos biológicos resultando na amplificação das reações inflamatórias (Kelley & Dantzer, 2011). O LPS induz os macrófagos a secretarem as citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ , além disso induz a secreção de NO, interferons, fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas e a expressão do IBA-1 (Christiansen et al., 2011, Zhu et al., 2017; Zheng et al., 2021).

Figura 5: Estrutura do LPS



O LPS é o componente externo da membrana de bactérias gram negativas, sendo composto por três estruturas: o antígeno O, o núcleo e o lipídio A. Fonte: Da Autora, 2023 adaptado de Steimle; Autenrieth; Frick, 2016

O LPS se liga à proteína de ligação ao LPS (LBP) e interage com o CD14 (um receptor de LPS de alta afinidade). O receptor Toll-like 4 (TLR4) em conjunto com a pequena proteína extracelular MD-2 irá interagir com o complexo CD14-LPS, ativando cascata de sinalização intracelular por meio de adaptadores que incluem IRAK e MyD88, que por sua vez ativam a molécula TRAF6, ativando as vias de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e a via do fator nuclear NF- $\kappa$ B. Essas vias convergem para ativar a transcrição da *NOS2*. Por outro lado, o interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) irá interagir com o receptor de interferon 1 (IFNR1) e o complexo IFNR2 ativa as cinases da família Jak e transdutores de sinal e ativadores das vias de transcrição (STAT), levando assim a expressão da enzima iNOS. Essa enzima é responsável pela conversão de L-arginina em NO e L-citrulina, o que leva a um excesso de NO e conseqüentemente ao estresse nitrosativo (figura 6) (Lowenstein & Padalko, 2004; Lin et al., 2015).

O TDM vem sendo associado a desregulação do processo inflamatório, pois ocorre o aumento dos níveis de marcadores inflamatórios como IL-6, PCR, TNF e IL- $1\beta$  (Dantzer, 2008, Almeida, et al., 2020). Diante disso o comportamento tipo-depressivo em animais pode ser induzido como uma resposta ao estímulo inflamatório periférico de fase aguda (Dantzer et al., 2008; Bay-Richter et al., 2011). Essa infecção bacteriana pode levar à neuroinflamação através da ativação do estresse oxidativo, nitrosativo e da ativação de redes de citocinas (Leonard & Maes, 2012), e dessa forma o LPS vem sendo utilizado como modelo para indução da neuroinflamação. Esta endotoxina pode ser reconhecida pelo sistema imune dos mamíferos, sendo considerado um padrão molecular associado a agentes patogênicos (PAMP) (Netea et al., 2002, Zhang & Ghosh, 2000). Portanto, alguns estudos evidenciaram que a administração de LPS por via intracerebral ou sistemicamente pode desencadear alterações de comportamento do tipo depressivo (Dantzer, 2008, Leonard & Maes, 2012 Thibeault, Laflamme, Rivest,2001; Rivest et al., 2003).

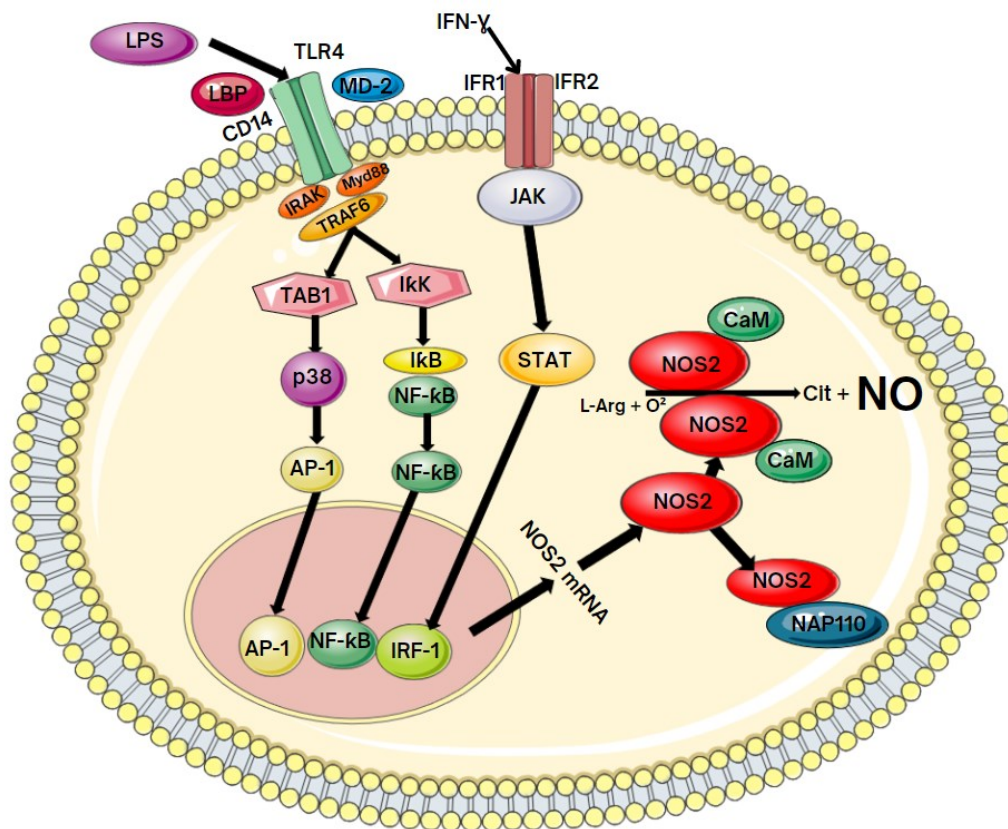
Estudos já evidenciam a eficiência do zinco em inibir o estresse oxidativo e a inflamação gerada pela administração de LPS (Hongxia, et al. 2019). Em outro estudo o tratamento com LPS diminuiu o peso corporal dos ratos, diminuiu a locomoção e, as frequências de respostas de levantar (*rearings*) e aumentou o tempo de imobilidade no campo aberto, além de aumentar os níveis plasmáticos de IFN-gama e a expressão de GFAP de astrócitos nos cérebros de ratos. Após o tratamento com zinco (3 dias consecutivos) foi evitada a perda de peso e a maioria das alterações comportamentais



relacionados ao comportamento doentio e comportamento tipo-depressivo induzidos por LPS e também preveniu o aumento dos níveis plasmáticos de IFN-gama e a astrogliose (GFAP) (Kirsten, et al., 2020).

Já em relação a vitamina D, He et al. (2019) utilizaram a vitamina D2 como um pré-tratamento a fim de aliviar os efeitos causados pela administração de uma dose única de LPS. Como resultado, verificaram que esta vitamina pode regular o processo de neuroinflamação mediado pela micróglia e a atividade local do sistema renina-angiotensina exercendo seu efeito antidepressivo, mostrando seu potencial efeito no tratamento de sintomas depressivos induzidos por inflamação sistêmica.

Figura 6: Ativação da via de sinalização por LPS que converge para iniciar a expressão de NO



O LPS fornece estímulos extracelulares que podem ativar vias de sinalização distintas que convergem para iniciar a expressão de NOS2. Fonte: Da autora, 2023, adaptado de Lowenstein, Padalko, 2004.

## 1.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Os fármacos para o tratamento do TDM estão disponíveis no mercado há mais de 50 anos, sendo eles os antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima

monoamina oxidase, os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS), os inibidores duplos de recaptção de serotonina e noradrenalina (ISRSN) e os que tem a capacidade de modular o ritmo circadiano e o sistema melatoninérgico, sendo esse um dos tratamentos mais recentes disponíveis para este transtorno (Frazer, 2000; Berton e Nestler, 2006; Chen e Skolnick, 2007; Leistedt e Linkowski, 2013).

O tratamento para o TDM é eficaz em cerca de 30% dos pacientes, sendo que a maioria irá precisar em dado momento substituir a medicação ou até mesmo fazer uma combinação de fármacos para obter uma resposta terapêutica efetiva, porém esses fármacos necessitam de um tempo de latência para obtenção da melhora clínica (entre 3-5 semanas) (Murrough, Lapidus, Soleimani, 2013; Zarate et al., 2013). Apesar dos inúmeros fármacos disponíveis para tratamento da depressão, existe um número considerável de pacientes refratários à terapêutica que permanecem com sintomas residuais incapacitantes (Anderson et al., 2000; Holtzheimer e Nemeroff, 2006). Contudo cerca de 30 a 50% dos pacientes apresentam remissão completa dos sintomas utilizando associação dos antidepressivos com a suplementação de nutracêuticos, tais como vitaminas e minerais (Berton e Nestler, 2006; Zarate et al., 2013; Wright, Eiland, Lorenz, 2013).

## 1.7 VITAMINA D

A vitamina D é uma substância lipossolúvel que quando ingerida na quantidade correta e necessária ou produzida endogenamente, previne o raquitismo e osteomalácia. Além de desempenhar um papel importante na homeostase do cálcio e do fosfato, desempenha inúmeros efeitos biológicos, auxilia também na função neuromuscular, regula a expressão e diferenciação celular e o sistema imunológico (Casseb et al, 2019; Föcker et al., 2018; Hernández-Viadel, 2021). Estudos sugerem que a deficiência de vitamina D pode estar associada ao aparecimento de doenças neurodegenerativas, como esclerose múltipla, Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (Wu et al., 2016), além de transtornos psiquiátricos como depressão e a os transtornos de ansiedade (Kouba et al., 2022).

A vitamina D é dividida 2 tipos: vitamina D2 (ergocalciferol), que é a forma encontrada em alimentos de origem vegetal e a vitamina D3 (colecalciferol) obtida por meio da ingestão de alimentos tais como ovos, peixes gordurosos como salmão, atum, cavala e frutos do mar (a ingestão não supre as necessidades fisiológicas), além de

ser obtida através da produção endógena por meio da fotólise do 7- dehidrocolesterol (7-DHC) após exposição solar a radiação ultravioleta B (UVB) na pele (Andriolli, 2018; Harrison et al., 2020; Jiang et al., 2020).

A síntese endógena de vitamina D3 inicia a partir da exposição da pele aos raios UVB, sendo que o 7-DHC (pró-vitamina D3) presente na pele sofre uma conversão química que dá origem ao pré-colecalciferol D3 (pré-vitamina D), o qual transforma-se em colecalciferol (vitamina D3), que é transportado pela corrente sanguínea ligado à proteína ligadora da vitamina D (DBP) até o fígado. No fígado as vitaminas D2 e D3 sofrem hidroxilação no carbono 25, pela ação da enzima microsomal da superfamília do citocromo P450 (CYP450) denominada CYP2R1, dando origem à 25-hidroxi-vitamina D ou calcidiol (25(OH)D3) e, no caso de ingestão de ergocalciferol, forma a 25-hidroxi-vitamina D2 (25(OH)D2). Estes compostos podem ainda sofrer uma nova hidroxilação no rim, onde a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) é convertida, pela enzima 25-hidroxivitamina D 1-alfa-hidroxilase (CYP27B1) em 1,25-diidroxivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D3] ou calcitriol que é a molécula metabolicamente ativa. Contudo, outra hidroxilação nos rins pode acontecer através da ação enzimática da 24-hidroxilase, convertendo a 25(OH)D em 24,25 di-hidroxivitamina D (24,25(OH)<sub>2</sub>D), um metabólito biologicamente inativo. Esse processo é importante pois mantém os níveis adequados de vitamina D no organismo, estabelecendo níveis não tóxicos da 1,25(OH)<sub>2</sub>D (figura 7) (Andriollo, 2018; Jiang et al., 2020; Remelli et al., 2019).

Figura 7: Síntese de vitamina D3

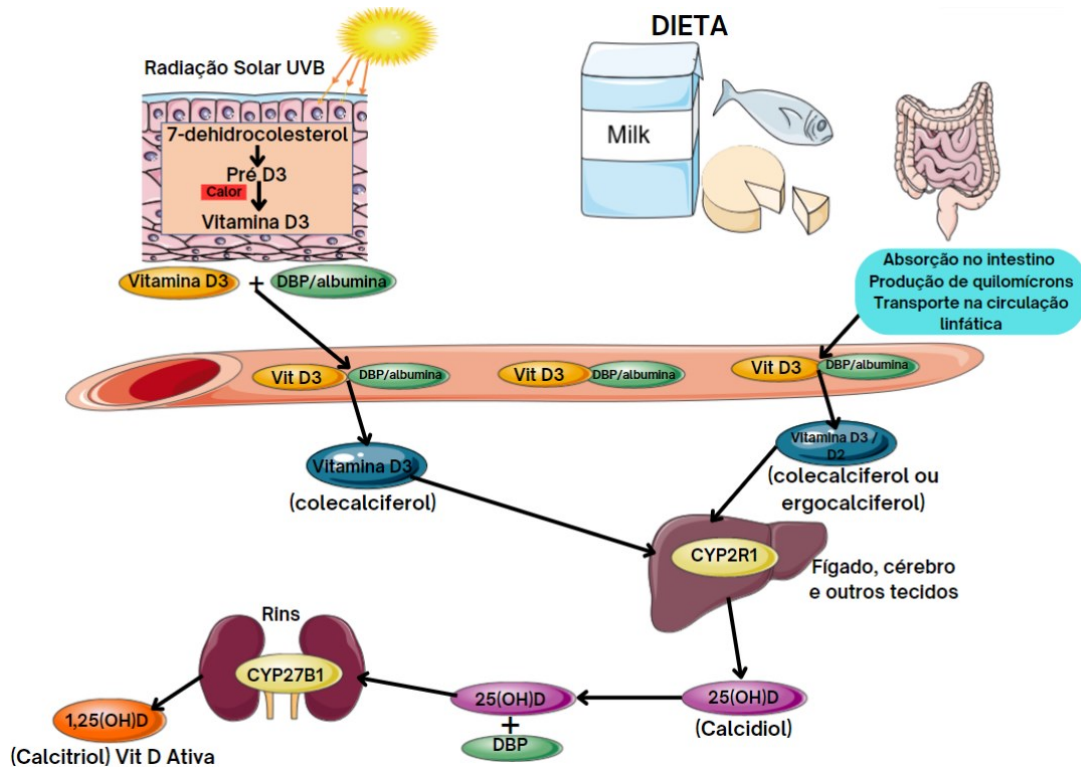


Figura 7: Síntese da vitamina D. A vitamina D pode ser obtida de duas maneiras: 1) a primeira delas é de forma endógena através da pele (vitamina D3 ou Colecalciferol), 2) a segunda é pela obtenção através da dieta (vitamina D2 ou ergocalciferol ou D3 ou colecalciferol). 3) A vitamina D originária da dieta é absorvida no intestino delgado e agregada aos quilomícrons, que a conduzem pela circulação linfática. Na circulação, a vitamina D2 ou D3 é transportada por DBP ou pela albumina. 4) Já a vitamina D proveniente dos raios UVB atinge a circulação e é conduzida por DBP ou pela albumina. 5) Após essa etapa se dá o mesmo processo para as duas formas. Tanto a vitamina proveniente da dieta quanto a obtida pelos raios UVB, são carregadas para o fígado, onde irá ocorrer a primeira hidroxilação no carbono 25 pela enzima CYP2R, formando 25(OH)D (calcidiol). 6) Esse produto é transportado por DBP para os rins, onde irá ocorrer a segunda hidroxilação, catalisada pela enzima CYP27B1, que resultará em 1,25(OH)D (calcitriol), forma ativa da vitamina D, que pode realizar diferentes funções biológicas. Fonte: Da autora, 2023, adaptado de Casseb, et al., 2019.

No SNC as atividades funcionais da [25(OH)D<sub>3</sub>] estão em evidência, pois este composto pode sofrer conversão pela ação da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase na sua forma ativa a partir de seu precursor [25(OH)D<sub>3</sub>], sugerindo um mecanismo alternativo de manutenção das atividades de [25(OH)D<sub>3</sub>] no encéfalo (Zehnder e Hewison, 1999). Além disso, os receptores de vitamina D (VDR) são encontrados tanto em neurônios como em células gliais (Casseb et al., 2019). Portanto a presença dos receptores VDRs e da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase nas regiões encefálicas (hipocampo e córtex pré-frontal) sugere um possível papel para a vitamina D na regulação de diferentes aspectos comportamentais, incluindo modulação do humor, ansiedade e cognição, além de elevar a expressão gênica responsável por codificar a tirosina hidroxilase, uma enzima precursora da dopamina e da norepinefrina. Além disso, a 25(OH)D

fornece considerável proteção contra a redução dos neurotransmissores dopamina e norepinefrina frente a intoxicação por metanfetamina (Porto; Silva; Sougey, 2019; Eyles et al., 2014).

Alguns pesquisadores, como Schaad et al. (2019) afirmam que a vitamina D é um ótimo aliado para diminuir sintomas da depressão, visto que esse hormônio apresenta propriedades neuroproteras e baixos níveis plasmáticos desta vitamina podem prejudicar a síntese de dopamina e serotonina. Uma revisão sistemática e metanálise publicada por Sppending (2014) mostrou que a suplementação de vitamina D superior a 800 UI/dia estava associada à melhora nos sintomas de depressão naqueles estudos nos quais houve uma melhora nos níveis de vitamina D.

Em outro estudo Kaviani et al. (2020) mostraram que a suplementação dessa vitamina, aumenta de forma expressiva as concentrações séricas de 25(OH)vitamina D em pacientes com depressão leve e moderada, onde houve efeitos benéficos na melhora dos sintomas depressivos. Já os altos níveis séricos de 25(OH) vitamina D contribuem com a diminuição dos sintomas depressivos no estudo transversal com 615 jovens adultos e, mesmo após o controle para idade, índice de massa corporal (IMC), sexo e tempo gasto ao ar livre, continuou com resultados significativos (Polak et al., 2014). Em outro estudo clínico, esta relação entre níveis séricos de 25(OH)vitamina D e sintomas depressivos realizado com 12.984 adultos de 30-75 anos que apresentavam níveis séricos de 25(OH) vitamina D abaixo do percentil 20 (55 nmol/l) ou acima do percentil 75 (70 nmol/l) foi observado que os participantes que estavam com nível de 25(OH)vitamina D baixo no início do estudo tinham mais sintomas de depressão do que participantes que estavam com altos níveis de 25(OH) vitamina D (Kjaergaard et al. 2012).

Muitos estudos pré-clínicos mostram evidencias de que a vitamina D pode auxiliar no tratamento da TDM. Estudos realizados por Camargo et al. (2018, 2020) e Souza (2019) administraram corticosterona (20 mg/kg, vo) durante 21 dias e colecalciferol (100, 300 e 1000 UI/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg), uma vez por dia durante os últimos 7 dias de tratamento com corticosterona e relatam que o tratamento com corticosterona resultou em comportamento tipo-depressivo, enquanto o colecalciferol (já na dose de 100 UI/kg) preveniu a ocorrência de um comportamento tipo-depressivo nos animais. Em um outro estudo no qual foi realizado o teste de natação forçada e a administração por via intraperitoneal de 1 $\alpha$ -hidroxivitamina D<sub>3</sub> (1

$\mu\text{g}/\text{kg}$  ou  $40 \text{ UI}/\text{kg}$ ) houve redução no tempo de imobilidade neste teste, sugerindo que  $1\alpha$ -hidroxivitamina  $D_3$  pode ter atividade tipo-antidepressiva (Kawaura, 2017).

Além de ter efeito antidepressivo, a vitamina D, também possui um papel imunomodulador através de suas ações antiinflamatória e anti-autoimune (LEAL, et al, 2020). Segundo Wimalawansa (2019), a vitamina D ameniza a inflamação e o estresse oxidativo associado ao aumento de NF- $\kappa$ B, visto que a vitamina D suprime o NF- $\kappa$ B reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo. Os efeitos biológicos da vitamina D no sistema nervoso também incluem a biossíntese de fatores neurotróficos, a inibição da síntese de iNOS e aumento dos níveis de GSH, o que sugere que esse hormônio tem efeitos neuroprotetores, anti-inflamatório, antioxidante e imunomodulador (Garcion et al., 2002; Casseb et al., 2019).

O estudo de Leal et al (2020) demonstrou o efeito periférico da vitamina D no processo anti-inflamatório, diante dos testes de edema de pata induzido por formalina e carragenina em camundongos, onde os mecanismos de ação do VD3 estão relacionados à redução TNF- $\alpha$ , e migração de leucócitos para o foco inflamatório e ativação de células imunes. Além disso, também foi evidenciado neste mesmo estudo que a vitamina D reduziu o estado inflamatório no cérebro dos camundongos, diminuindo as expressões de iNOS e COX-2.

Segundo Dursun, Gezen-Ak, Yilmazer (2014) o tratamento com vitamina D durante 24 e 48 horas causou uma diminuição significativa na expressão da iNOS, no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos. Ao diminuir a expressão cerebral de iNOS, a vitamina D exerce um efeito antioxidante e uma diminuição do estresse oxidativo, o que poderia explicar em parte seu efeito neuroprotetor (Lima et al., 2018).

No processo inflamatório os neutrófilos migram para o local da inflamação, gerando mediadores químicos (espécies reativas de oxigênio e TNF- $\alpha$ ) (Morris, 2003). O papel do TNF- $\alpha$  na inflamação foi demonstrado pela ação antiinflamatória de drogas que bloqueiam sua atividade (Bradley, 2008). Desta forma o efeito antiinflamatório da vitamina D pode estar associado à sua capacidade de reduzir o acúmulo de células polimorfonucleares reduzindo a expressão do TNF- $\alpha$  no sítio inflamatório (Lima, et al, 2020).

Além disso os níveis baixos de vitamina D estão relacionados a marcadores inflamatórios aumentados, e associado a várias doenças inflamatórias, indicando que a sinalização mediada pela vitamina D modula muitas respostas inflamatórias que

podem estar associados à deficiência cognitiva e a doenças neurodegenerativas, além de transtornos psiquiátricos (Wöbke, Sorg, Steinhilber, 2014).

## 1.8 ZINCO

O zinco ( $Zn^{2+}$ ), o segundo oligoelemento mais prevalente no corpo humano, é essencial na atividade de mais de 300 enzimas e indispensável em muitas vias bioquímicas importantes para os mecanismos fisiológicos essenciais, como o funcionamento das estruturas cerebrais e neurais, além da atuação como protetor contra o estresse oxidativo e nitrosativo (Starowicz, 2019). A concentração mais alta de zinco ocorre no hipocampo e na amígdala, onde atua como neuromodulador da transmissão sináptica em receptores AMPA, NMDA, GABAérgicos e cainato (Starowicz, 2019; Nakatani, et. al., 2021). O zinco atua sistemicamente, como cofator em enzimas que participam de muitas reações do metabolismo celular como: divisão celular, síntese de DNA e RNA, defesa antioxidante, crescimento, desenvolvimento e vias de sinalização celular (Takeda, 2000; Nakatani, et. al., 2021).

O zinco pode ser obtido através de uma dieta rica em alimentos de origem animal como: frango, peixes (sardinha), ostras, mariscos, carnes vermelhas, fígado, miúdos, ovos, e em alguns alimentos de origem vegetal como: nozes, leguminosas, castanhas, gergelim e linhaça, sendo que sua absorção ocorre no trato gastrointestinal mais precisamente no intestino delgado na região do duodeno e nos primeiros segmentos do jejuno (Salgueiro et al, 2000; Tapiero e Tew, 2003; Souza, et al., 2021). A albumina é a proteína sérica responsável pelo transporte desse micronutriente. Como o corpo humano não possui uma reserva especializada de zinco, é crucial garantir uma ingestão diária adequada desse metal (Feijó, 2019).

Figura 8: Metabolismo e o mecanismo de absorção do zinco

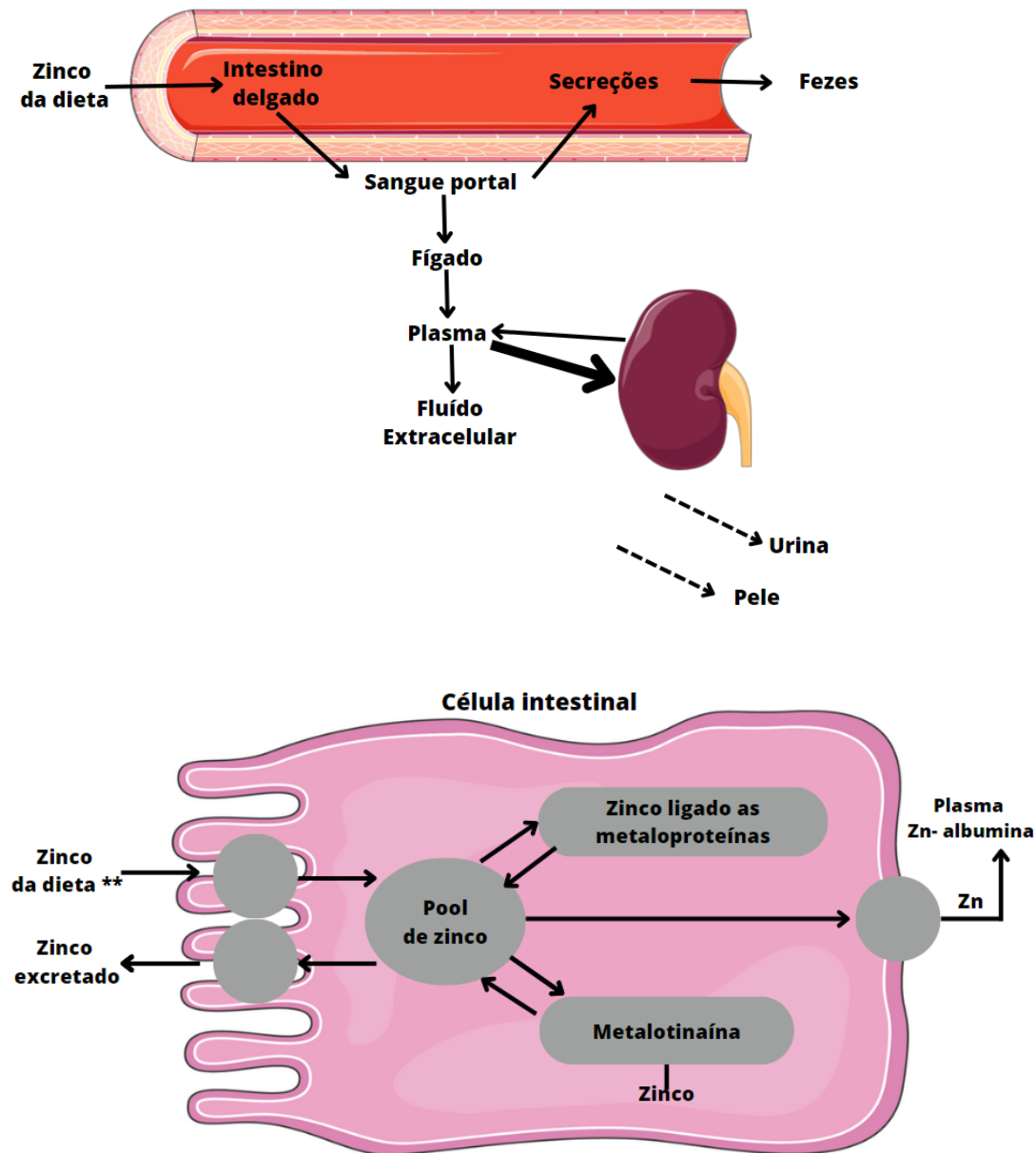


Figura 8: Metabolismo e o mecanismo de absorção do zinco: O zinco proveniente da alimentação é absorvido no intestino delgado, em seguida é transportado ligado a albumina (predominantemente) na via de circulação porta para o fígado para ser redistribuído aos diversos tecidos. No sangue, o zinco é encontrado nos eritrócitos (80%) e nos leucócitos. As vias de excreção são fezes e urina, descamação da pele, cabelo, sêmen e menstruação. Fonte: Da autora, 2023, adaptado de Mazzucchetti, Cardoso [S.D]

Uma dieta deficiente de zinco pode provocar alterações cerebrais que estão envolvidas na depressão, podemos citar: diminuição nos níveis de glutamato, GABA e glutamina no hipocampo (Tamano et al., 2009) e um aumento de glutamato extracelular hipocampal (após estimulação com cloreto de potássio) e dos níveis



séricos de corticosterona (Watanabe, et al. 2010), diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal (Doboszewska, et al. 2015) e reduzida expressão do receptor do BDNF, TrkB, no hipocampo (Mlyniec, et al. 2014).

No SNC, o zinco desempenha um papel importante nos processos fisiológicos e patológicos, pois interage com receptores de neurotransmissores, apresentando efeitos de acordo com sua concentração, além de ter o efeito de longo alcance na cognição, estabilidade emocional e memória (Frederickson, Koh, Bush, 2005; Li, et al, 2022). O zinco pode atuar como antagonista parcial de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA (Sensi, Paoletti, Koh, 2011; Anderson et al., 2015). Um estudo mostrou que vítimas de suicídio apresentaram uma diminuição na potência de zinco quanto a sua ação como antagonista do receptor de NMDA, contribuindo para a hiperatividade desse receptor (Sowa-Kucma, et al., 2013).

Em relação ao sistema monoaminérgico, o zinco pode exercer um efeito mais expressivo no sistema serotoninérgico, pois quando ocorre a administração de antagonistas de receptores serotoninérgicos dos subtipos 5-HT1A e 5-HT2A/2C os efeitos tipo-antidepressivo do zinco são prevenidos, o que sugere que uma modulação do sistema serotoninérgico possa estar envolvida nos efeitos desse mineral (Szewczyk, et al. 2009; Satała et al., 2016).

O zinco também tem a capacidade de se ligar em receptores próprios, os GPR39, que são receptores acoplados à proteína G, que medeiam a ativação de várias vias de sinalização intracelular, em destaque para a ativação do fator de transcrição CREB, promovendo à regulação positiva do BDNF (Mlyniec, et al. 2015). Em estudos realizados com roedores alimentados com uma dieta deficiente de zinco, ocorreu uma diminuição na expressão do GPR39 cerebral, bem como do BDNF (Mlyniec, et al. 2013; Mlyniec, et al. 2014). Em um outro estudo realizado em camundongos geneticamente modificados que não possuem o receptor GPR39 no cérebro, foi observado um comportamento tipo-depressivo nestes animais, os quais também não foram sensíveis à administração de fármacos antidepressivos como a imipramina, reboxetina e escitalopram, evidenciando que o receptor de zinco GPR39 é importante para ação desses fármacos antidepressivos (Mlyniec, Gawel, Nowak, 2015).

Estudos também mostraram que a administração de zinco está associada a um aumento da expressão ou imunoconteúdo do BDNF no córtex e no hipocampo de roedores (Nowak, et al. 2004; Cieslik, et al. 2011). Confirmando a importância do

BNDF para o efeito antidepressivo do zinco, a inibição do receptor de BDNF (TrkB) foi efetiva em abolir o efeito tipo-antidepressivo do zinco (Manosso, et al. 2017).

O zinco é um inibidor muito potente do receptor de NMDA e exerce efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado em ratos e camundongos (Krocza et al. 2001; Szewczyk, et al. 2002). A ação do tipo-antidepressiva desse metal parece depender da capacidade desse mineral em inibir receptores de glutamato do tipo NMDA (Rosa, et al. 2003). O zinco também diminui a afinidade da glicina (co-agonista do receptor de NMDA) nos receptores de NMDA no córtex pré-frontal (Cichy, et al. 2009), e confirmando sua importância na modulação de neurotransmissão glutamatérgica, o zinco possui a capacidade de aumentar o imunoconteúdo de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAC1 ou EAAT3) no hipocampo de camundongos (Manosso, et al. 2016). Estes transportadores regulam a respostas dos receptores extrasinápticos que contém receptores NMDA, e no hipocampo, podem também modular as sinapses GABAérgicas por promover a síntese de GABA (Underhill et al, 2019). A neurotransmissão adenosinérgica pode também influenciar a resposta do zinco, pois a ativação de receptores de adenosina A1 e A2A está envolvida no efeito tipo-antidepressivo exercido pelo zinco (Lobato, et al. 2008). Além disso ele foi capaz de prevenir a redução na atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase (hipocampo) e glutathione peroxidase (córtex cerebral) induzida pela exposição ao organofosforado malation no cérebro de ratos, sendo este efeito associado a reversão do comportamento depressivo induzido pelo malation (Brocardo, et al. 2007). Segundo Manosso et al. (2016) a ativação da enzima antioxidante heme-oxigenase 1 (HO-1) e/ou de seu fator de transcrição Nrf2, parecem estar também envolvidas com os efeitos antidepressivos do zinco.

A administração de zinco também potencializou o efeito de fármacos antidepressivos em camundongos no teste da suspensão pela cauda (Cunha et al., 2008). Esse mineral pode influenciar diversas vias de sinalização intracelular, colaborando assim para os efeitos antidepressivos. Estudos pré-clínicos mostram que seu efeito antidepressivo depende de vários eventos moleculares: inibição da via da L-arginina-óxido nítrico (Rosa, et al. 2003), ativação da via da mTOR e ativação de vias de sinalização que culminam na ativação do CREB (incluindo CAMK-II, PKA, PKC, MAPK/ERK e PI3K) e a inibição do glicogênio sintase cinase- 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), que na forma ativa inibe o CREB (Manosso, et al. 2015).

Os estudos clínicos também demonstram uma relação entre o zinco e a depressão, em uma meta-análise que avaliou 17 estudos, foi comprovada a associação entre o baixo nível de zinco no sangue (sérico e plasmático) com a depressão (Swardfager, et al., 2013). Alguns estudos vêm sugerindo que mulheres são mais susceptíveis ao desenvolvimento de comportamento depressivo quando deficientes de zinco em relação aos homens (Nguyen, et al. 2019). Neste estudo clínico foi evidenciado o efeito antidepressivo através da suplementação com zinco, visto que seu baixo nível sérico foi encontrado em pacientes que sofrem de depressão quando comparado com um controle de pacientes deprimidos, além disso também houve uma redução no escore na escala de Hamilton de depressão quando se associa a suplementação de zinco (25 mg/dia, de 6 a 12 semanas) com fármacos antidepressivos convencionais (Nowak et al., 2003). Também tem sido evidenciado uma melhora nos sintomas depressivos em pacientes com sobrepeso e obesidade (sem diagnóstico de depressão), os quais receberam suplementação com zinco por 12 semanas (Solati, et al. 2015).

O zinco é capaz de diminuir as EROs por atuar por vários mecanismos: inibe a enzima NADPH oxidase, é necessário para a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (que diminui os níveis do ânion superóxido) e induz a expressão de metalotioneínas que são proteínas que promovem a redução do radical hidroxila. Desta forma, este metal pode prevenir danos oxidativos (PRASAD, 2009). Além destes efeitos, o zinco tem ação anti-inflamatória e regula o sistema imunológico como a resposta inflamatória inata e adaptativa e a proliferação e diferenciação de células imunológicas (Haase e Rink, 2014). A deficiência desse metal pode levar ao estresse oxidativo, indução de apoptose e disfunção celular, diminuição da quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos e aumento dos níveis séricos de citocinas inflamatórias que participam da fisiopatologia da depressão, como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 (Jarosz et al., 2017; Bao et al., 2010; Dowlati et al., 2010; Liu et al., 2011), porém estes efeitos podem ser evitados com sua suplementação (Hongxia et al, 2019).

Em um estudo realizado por Hongxia et al. (2019) a suplementação com zinco bloqueou a formação de EROs, e reduziu a expressão de citocinas inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-6) e também a expressão de iNOS e COX2 induzidos por LPS em células BV2. Estes dados sugerem que o zinco pode diminuir a neuroinflamação induzida por LPS, mostrando seu efeito neuroprotetor. Além disso o defeito da proteína A20, a qual é capaz de inibir a ativação do NF-kB, resulta em neuroinflamação (Guedes et al.,

2014), e ao tratar as células BV2 com LPS na presença de zinco ocorreu a indução da expressão da A20 inibindo a sinalização de NF- $\kappa$ B, levando ao declínio dos níveis de fosforilação de p65 e I $\kappa$ B (Hongxia, et al, 2019).

Algumas evidências sugerem que o NO derivado de iNOS está envolvido na homeostase do zinco, na indução de sua liberação intracelular a partir de aglomerados de enxofre e zinco (encontrado em proteínas como metalotioneína) e controle do tráfego de zinco nas células endoteliais protegendo as mesmas contra danos mediados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Berendji, et al, 1997; Cortese-Krott, et al, 2014; Croix, et al, 2004; Spahl, et al, 2003). Um estudo relatou que a atividade *in vitro* da iNOS em macrófagos ativados pode ser inibida em mais de 90% por zinco na concentração de 100  $\mu$ M (Stuehr e Griffith, 1992), já nos queratinócitos, a suplementação de zinco diminuiu os níveis da iNOS (Yamaoka, 2000). Confirmando esses achados Cortese-Krott et al. (2014) demonstraram que o zinco limita a produção de NO em células endoteliais ao inibir a expressão de iNOS dependente de NF- $\kappa$ B. Portanto, o zinco participa do controle da sinalização de iNOS e contribui para a estabilização do endotélio na inflamação, limitando assim as respostas mediadas por NF- $\kappa$ B.

## 1.9 ASSOCIAÇÃO DA VITAMINA D E ZINCO

A intervenção nutricional pode ser considerada uma grande aliada no tratamento de muitas doenças, inclusive na depressão, pois como a deficiência de zinco e vitamina D podem induzir um comportamento tipo-depressivo, alguns estudos têm mostrado resultados positivos para o uso do zinco e vitamina D na depressão, porém, em geral, de forma isolada obtendo resultados positivos como mencionado anteriormente (Yosae, 2019).

O zinco é necessário para que o 1,25-dihidroxicolecalciferol exerça seus efeitos biológicos. O VDR pode interagir especificamente com regiões de dedos de zinco. Os dedos de zinco contêm um ou dois íons e encontram-se em muitos fatores de transcrição, incluindo os associados com o VDR (Amos e Razzaque, 2022). O estudo realizado por Yu e colaboradores (2006) mostrou que ratos que receberam uma dieta deficiente em zinco mostraram uma menor expressão na mucosa intestinal tanto da proteína VDR quanto da proteína CaBP, quando comparado com os animais que receberam a dieta adequada em zinco, indicando que a deficiência de zinco tem efeito na expressão e funções do VDR. No estudo clínico realizado com mulheres na pós-

menopausa, a suplementação de 8 semanas com zinco aumentou os níveis de vitamina D (Vázquez-Lorente et al., 2021). Em um outro estudo realizado com crianças e adolescentes houve uma associação positiva entre os níveis séricos de zinco e vitamina D, pois os níveis de vitamina aumentaram juntamente com os níveis de zinco (Shams et al., 2016). Em um estudo que utilizou a dose de 2.000 UI de vitamina D e 30 mg de zinco por dia durante 12 semanas em 140 pacientes obesos com sintomas depressivos leves e moderados, foi observada uma melhora nos sintomas de depressão (Yosae, 2020).

Outros estudos que utilizaram a co-suplementação de zinco e vitamina D, porém para outros fins, obtiveram resultados promissores no raquitismo (Worker, Migicovsky, 1961), na disfunção erétil em pacientes idosos (Ahn, et al. 2019) e no estímulo da formação óssea, com propriedade osteoprotetora (Zofkova, Nemcikova, Matucha, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

O TDM é um transtorno com alta prevalência no mundo, sendo um dos principais problemas de saúde pública. Existem hoje muitos tratamentos disponíveis que são seguros, porém não são o ideal, por possuírem limitações e efeitos colaterais, além do fato de a grande maioria dos pacientes (30%) serem resistentes ao tratamento convencional, o que coloca as taxas de remissão dos sintomas depressivos em um nível insatisfatório (Otte et al., 2016)

No âmbito do tratamento muitos estudos estão em busca de terapêuticas alternativas, principalmente com nutracêuticos como a vitamina D. A suplementação com essa vitamina pode produzir efeito do tipo-antidepressivo em alguns testes comportamentais (Camargo et al, 2018, Casseb et al., 2019). O zinco também pode ser citado como um bom aliado para a melhora dos sintomas da depressão, pois há evidências que indicam que o mesmo pode exercer efeito antidepressivo (Manosso, 2017; Yosae et al., 2020).

Os benefícios da vitamina D e do zinco na depressão são bem sugestivos, porém a maioria dos estudos utilizam esses compostos de forma isolada. Em um estudo recente os autores analisaram os efeitos da co-suplementação de vitamina D com zinco nos sintomas de depressão em indivíduos obesos e obtiveram bons resultados como a diminuição significativa na pontuação do inventário de depressão de Beck (Yosae et al, 2020).

Evidências sugerem que a inibição das funções pró-inflamatórias da microglia é uma estratégia promissora para reduzir sintomas de depressão, e a vitamina D inibiu a expressão de mRNAs, que codificam iNOS, IL-6 e IL-1 $\beta$ , além de inibir também a ativação da cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B induzidas por LPS. Isso indica que vitamina D pode inibir a produção de várias moléculas pró-inflamatórias na micróglia, e a inibição da ativação de ERK está pelo menos parcialmente relacionada ao efeito antiinflamatório desta vitamina (Dulla, et al., 2016).

O zinco também se destacou por ter um papel importante na depressão causada pela neuroinflamação. O zinco pode inibir as respostas inflamatórias em células da microglia, além de aumentar os efeitos inibitórios da sinalização da NF- $\kappa$ B (Hongxia et al., 2019).

Diante desses achados a utilização de vitamina D associada ao zinco pode vir a ser uma alternativa promissora para o tratamento da depressão associada à neuroinflamação, além disso esses compostos são de fácil acesso.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito tipo-antidepressivo da colecalciferol e cloreto de zinco isoladamente e em combinação em um modelo animal de depressão induzido por LPS.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a administração de colecalciferol é capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração do LPS.

- Avaliar se a administração de cloreto de zinco é capaz de prevenir o comportamento tipo depressivo induzido pela administração do LPS.

- Avaliar se a administração combinada de colecalciferol e cloreto de zinco é capaz de prevenir o comportamento tipo depressivo induzido pela administração do LPS.

- Investigar o efeito da administração de colecalciferol e cloreto de zinco isoladamente e em combinação sobre os níveis de NOx no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao desafio do LPS.

- Analisar o efeito da administração de colecalciferol e cloreto de zinco isoladamente e em combinação sobre o estresse oxidativo induzido pela administração de LPS na área cerebral córtex pré-frontal através da determinação da taxa de peroxidação lipídica (malondialdeído – MDA).

- Analisar o efeito da administração de colecalciferol e cloreto de zinco isoladamente e em combinação sobre o estresse oxidativo induzido pela administração de LPS na área cerebral córtex pré-frontal através da verificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO

Para este estudo foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (30-40 g) com 55-60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), SC- Florianópolis. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, em ambiente controlado ( $20-22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12h ciclo claro/escuro, com luzes acesas as 7:00 a.m.), com comida e a água ad libitum, foram divididos em grupos de 8 animais por caixas (dimensão 49x 34x 16 cm) de polipropileno opaco branco com tampa de arame.

Para o início do experimento os animais foram colocadas na sala de experimentação para aclimação 24 horas antes dos tratamentos, manipulação e testes, que foram realizados entre as 8h e as 17h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia do National Institute of Health para o cuidado e uso de animais de laboratório e todos os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética da UFSC (protocolo nº 9317190221, ID 001786). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados.

### 4.2 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Os tratamentos farmacológicos foram feitos com veículo por via oral (p.o.), colecalciferol (1000 UI/kg, p.o.), Cloreto de Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) (10 mg/kg, p.o.) e LPS (0,5 mg/kg). Todos os fármacos foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, exceto a colecalciferol que foi obtida comercialmente (Addera).

O  $\text{ZnCl}_2$  e o colecalciferol foram administrados por via oral (p.o.) e o LPS por via intraperitoneal (i.p.). Os fármacos foram preparados antes de cada administração: o colecalciferol foi dissolvido em óleo de girassol, o  $\text{ZnCl}_2$  foi diluído em água destilada e o LPS em salina (solução de cloreto de sódio a 0,9 g%). Todas as doses e momentos de administração foram escolhidos com base em estudos anteriores (Camargo et al. 2020; Manosso, 2016).

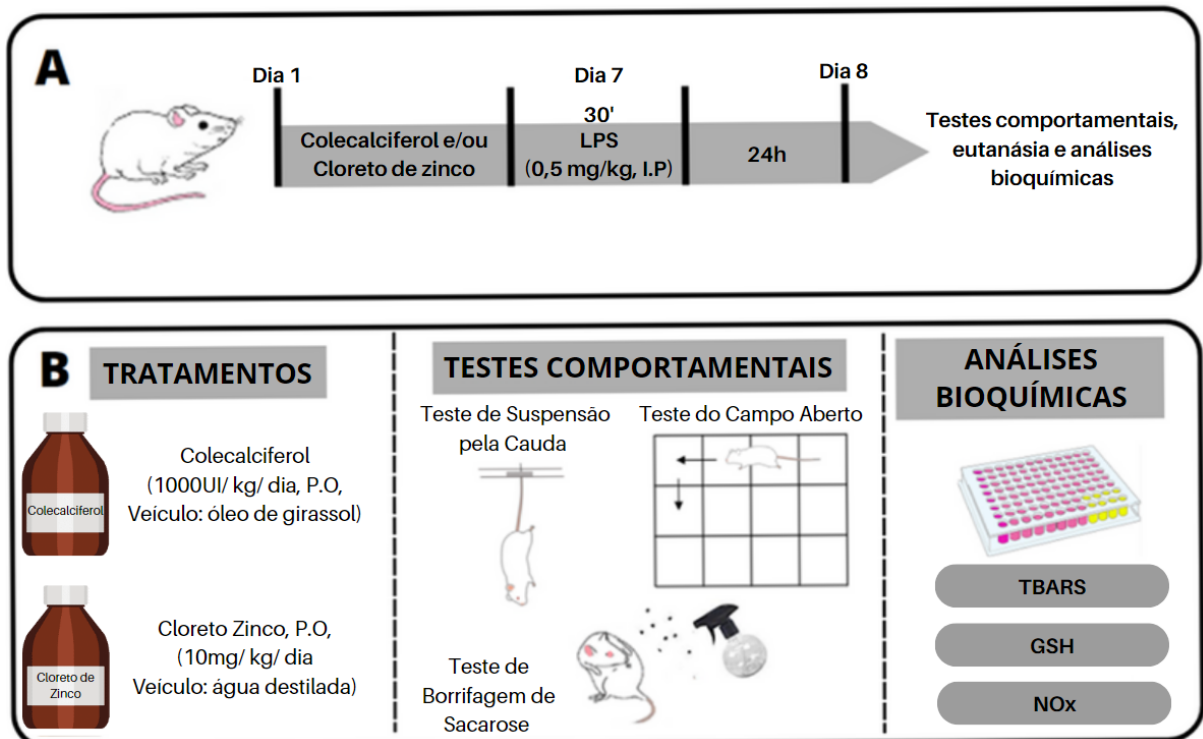
### 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a determinação do efeito preventivo do colecalciferol, zinco ou do colecalciferol e zinco sobre o comportamento tipo-depressivo induzido por LPS foram utilizados 8 grupos, cada um constituído de 8 animais. (1) Controle com veículo (óleo de girassol) p.o. + salina i.p.; (2) Grupo tratado com colecalciferol p.o. + salina i.p.; (3) Grupo tratado com Cloreto de Zinco p.o. + salina i.p.; (4) grupo tratado com Cloreto de Zinco e com colecalciferol p.o + salina i.p.; (5) Grupo tratado com veículo (óleo de girassol) p.o. + LPS i.p; (6) Grupo tratado com colecalciferol p.o. + LPS i.p. +; (7) Grupo tratado com Cloreto de Zinco p.o. + LPS i.p.; (8) Grupo tratado com do colecalciferol + Cloreto de Zinco p.o. + LPS i.p.

O tratamento preventivo consistiu em administrar os fármacos (colecalciferol e Cloreto de zinco) por 7 dias consecutivos (entre 8h e 12h), após 30min da administração dos compostos foi administrado o LPS (dose única), e após 24h da administração do LPS, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (8º dia), sendo eles: teste de suspensão pela cauda, teste de campo aberto e teste de borrifagem de sacarose, com intervalo de 10 min entre os testes.

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados imediatamente por decapitação, e após foi realizado a retirada do córtex pré-frontal para a realização das avaliações bioquímicas.

Figura 9: Protocolo Experimental



A Figura 9 detalha o protocolo experimental do trabalho. A) Cronograma do experimento: tratamento prévio de 7 dias com colecalciferol, cloreto de zinco, associação dos compostos e óleo de girassol. No dia 7, após 30 minutos da última administração do tratamento, foi realizado a administração do LPS (0,5 mg/kg, i.p.) ou salina (grupo controle). Após 24h da administração foram realizados os testes comportamentais. B) Tratamentos; testes comportamentais e avaliação bioquímica Fonte: A Autora, 2023.

## 4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.4.1 Teste de Suspensão Pela Cauda (TSC)

O teste da suspensão pela cauda é um procedimento experimental utilizado para avaliar a eficácia da atividade do tipo-antidepressiva de tratamentos com fármacos em camundongos. O teste registra o tempo total de imobilidade de cada animal de acordo com o método proposto por Steru et al. (1985).

Os camundongos foram visualmente isolados e suspensos pela cauda 50 cm acima do chão com o auxílio de uma fita adesiva presa a 1cm a partir da ponta da cauda. A imobilidade foi registrada durante 6 minutos, por um observador experiente. Os camundongos foram considerados imóveis quando ficavam completamente

parados. A diminuição de tempo de imobilidade é considerada um efeito do tipo-antidepressivo (Steru et al., 1985).

#### **4.4.2 Teste do Campo Aberto (TCA)**

Os mesmos animais que receberam tratamento farmacológico e realizaram o TSC foram submetidos ao TCA após 10 minutos. Este teste ajuda a excluir a possibilidade de que uma alteração no tempo de imobilidade no TSC possa ser devido a um estímulo locomotor. Porém este teste também serve também como um indicativo do seu estado emocional, sendo que uma redução no tempo no centro do aparato indica um comportamento de ansiedade do animal (Fraga et al., 2018).

O TCA foi realizado em uma caixa de madeira (40x60x50 cm), com o chão dividido em 12 quadrantes iguais para assim avaliar a atividade locomotora do animal. Para o teste o camundongo foi colocado no canto esquerdo da arena, e assim autorizado a explorar com total liberdade a mesma. Foram critérios de avaliação o tempo de atividade locomotora o número total de cruzamentos no aparato (realizado com as quatro patas) e como critérios de avaliação de comportamento relacionado à ansiedade o registro da latência e o tempo total dispendido no centro do campo aberto (o aumento do tempo dispendido no centro é sugestivo de atividade ansiolítica). Também foram registrados a latência e tempo total de auto-limpeza (indicativos de comportamentos relacionados à ansiedade) (Colla et al., 2015; Fraga et al., 2018). Os testes foram gravados utilizando uma câmera de vídeo digital (webcam Logitech HD C525, CA, EUA) e analisados usando o ANYmaze video-tracking system (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA),

O teste foi realizado em uma sala com temperatura e luz controlada, e a cada troca de animal o chão da caixa foi higienizado com etanol 10%.

#### **4.4.3 Teste de Borrifagem de Sacarose (TBS)**

O teste de borrifagem de sacarose consiste na borrifação de uma solução contendo sacarose a 10% (p/v) no dorso do animal dentro de uma caixa transparente (9 × 7 × 11 cm). Devido a viscosidade a solução de sacarose, os camundongos iniciam o comportamento de autolimpeza. Após a aplicação da sacarose, o tempo gasto até o primeiro episódio de autolimpeza e o tempo total de autolimpeza foram registrados

por 5 min, como um índice de autocuidado e comportamento motivacional, considerando qualquer comportamento apático como sintoma de depressão (Willner, 2005; Moretti et al., 2012, Camargo et al, 2020). A cada troca de animal, o aparato foi limpo com solução de álcool a 10% para remover as pistas olfativas do animal anterior.

## 4.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

### 4.5.1 Homogenato de Córtex Pré-frontal

Para os métodos de detecção de malondialdeído, produto de peroxidação lipídica (TBARS) e determinação dos níveis de tióis não-proteicos (glutathiona-reduzida- GSH) e dos níveis de NOx foi utilizado o córtex pré-frontal. O tecido foi homogeneizado com tampão Tris/HCl 100 mM pH 7,4 (proporção 1:20). A centrifugação foi feita na velocidade de 2200 r.p.m. (400g) a 4°C por 10 minutos, logo após foi retirado o sobrenadante que foi utilizado para a realização dos métodos. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

### 4.5.2 Detecção de Malondialdeído, Produto de Peroxidação Lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica é determinada pela quantidade de lipídeos peroxidados através das substâncias que reagiram com o ácido tiobarbitúrico. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são compostas de diversos produtos finais de baixo peso molecular formados via decomposição de certos produtos primários e secundários da peroxidação lipídica. A análise da quantidade de TBARS é utilizada como um índice de estresse oxidativo. O cálculo foi realizado usando-se uma curva padrão de malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica. O método detecta uma alteração na absorção de luz pelo complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico em 532nm, tendo um coeficiente de extinção molar de  $135.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Para iniciar o método foram utilizados tubos de vidro (limpos com ácido nítrico) e preparo o mix contendo: amostra (tecido homogeneizado anteriormente) (125 uL), SDS 8,1% (75 uL), tampão de ácido acético (150 uL) e TBA 0,6% (150 uL), em seguida foi incubado em banho-maria a uma temperatura de 95°C, por 30 minutos. A leitura da densidade ótica foi realizada no TECAN- Multileitora de placas- Infinite M200 com absorvância de 532 nm.

### **4.5.3 Determinação dos Níveis de Tióis Não-Proteicos (Glutathiona reduzida-GSH)**

A glutathiona um agente antioxidante produzido por células animais, o qual pode ser encontrado em duas formas: a forma oxidada (GSSG) ou na forma reduzida (GSH). Portanto o método é baseado na determinação de tióis não protéicos, dos quais a grande maioria (cerca de 90%) é GSH, a qual é mensurada a partir da reação com o reagente de Ellman [DTNB; ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico)], produzindo o composto ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico, que tem cor amarela e pode ser mensurado espectrofotometricamente em 412 nm (Ellman, 1959).

### **4.5.4 Determinação dos Níveis de NOx**

O NO é instável e rapidamente oxidado a nitrato e nitrito (NOx) após sua produção. Os metabólitos foram determinados utilizando a análise de NOx conforme o Método de Griess (Ellis, 1998). O método se baseia na detecção do NO, sendo o nitrato convertido a nitrito pela reação enzimática de nitrato redutase, utilizando a reação colorimétrica de Griess. Essa reação permite a mensuração do NO total (nitrato + nitrito = NOx) presente no homogenato do córtex pré-frontal.

Inicialmente foi preparado a curva-padrão de forma seriada, para isso foi preparado a solução-estoque de nitrito de sódio com concentração de 1000mM (estocada à 4°C e protegida da luz). Para cada 100mL da solução, solubilizou-se 0,69 g de nitrito de sódio em água destilada (utilizar balão volumétrico). Em seguida, foi feito a solução para diluir 100 mM 98,6mL de solução-mãe em 1000mL de água. Para o primeiro ponto da curva, adicionou-se 100mL da solução anterior (100mM) em 1000mL de água destilada, em seguida realizou-se as soluções seriadas.

## **4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

O conteúdo das proteínas foi quantificado de acordo com o método de Peterson (Peterson, 1977). A absorbância foi lida em 595 nm em espectrofotômetro e para a curva padrão foi utilizada albumina de soro bovino.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através da análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido do teste post hoc de Newman-Keuls, quando apropriado. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste D'Agostino-Pearson. Foram considerados significativos os resultados com  $p < 0,05$  e para a realização das análises utilizou-se os softwares GraphPad® versão 9.0 e Statistica versão 13.5.0.17 e Microsoft Excel® para tratamento dos dados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU CLORETO DE ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA E NO CAMPO ABERTO

A fim de investigar se o tratamento com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos produz atividade do tipo-antidepressiva em animais tratados com LPS, os camundongos foram submetidos ao TSC, avaliando o tempo de imobilidade. A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos dos tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos [ $F(3,56) = 98,48$ ,  $P < 0,0001$ ], do LPS [ $F(1,56) = 26,80$ ,  $P < 0,0001$ ] e da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3,56) = 9,291$ ,  $P < 0,0001$ ] no TSC. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que o LPS aumentou significativamente o tempo de imobilidade em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) e os tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos preveniram o aumento do tempo de imobilidade causado pelo LPS ( $p < 0,001$ ), conforme mostrado na Figura 10 A.

Com a finalidade de investigar alterações na atividade locomotora e exploratória dos animais, foi realizado o teste de campo aberto. Nesse teste, em relação à distância percorrida pelos animais (Figura 10 B) o teste ANOVA de duas vias não indicou efeito principal dos tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco, colecalciferol e cloreto de zinco [ $F(3, 56) = 1,028$ ,  $P = 0,3873$ ], do LPS [ $F(1,56) = 4,005$ ,  $P = 0,0502$ ] e da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3,56) = 1,798$ ,  $P = 0,1581$ ].



Figura 10- Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou cloreto de zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS no teste de suspensão pela cauda e no campo aberto

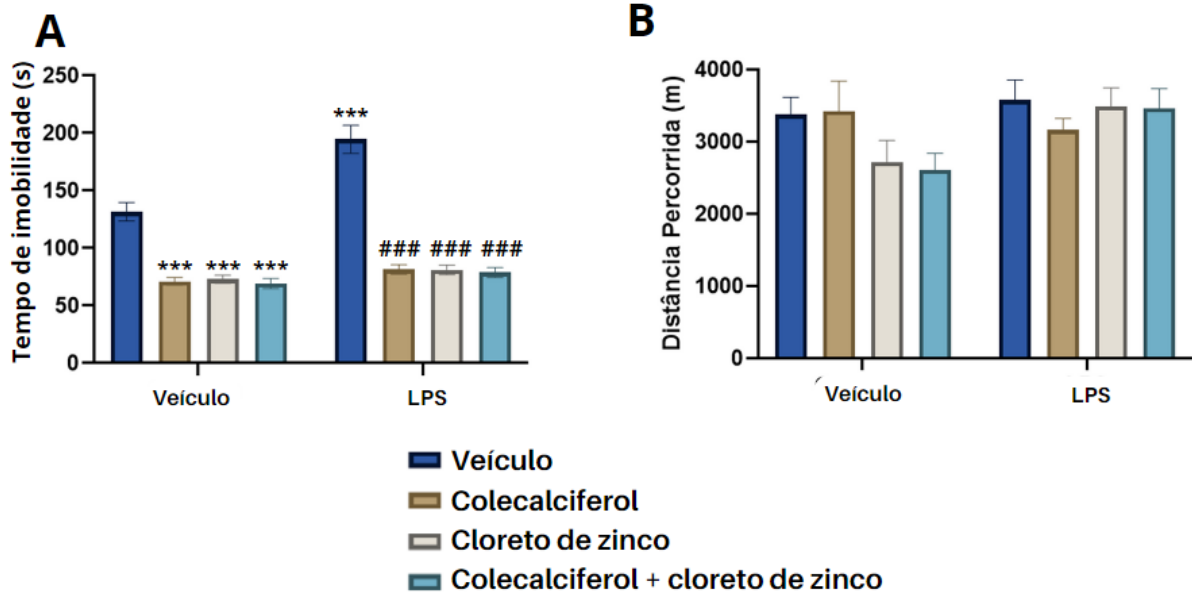


Figura 10: Efeito da administração por 7 dias de colecalciferol (1000 UI/Kg/dia) e/ou cloreto de zinco (10 mg/kg/dia) e posterior administração de LPS (0,5 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (A) e distância percorrida (B) no teste do campo aberto em camundongos. Os valores são expressos como média  $\pm$  S.E.M (n = 8). \*\*\* P < 0,001 comparado com o grupo veículo; ### P < 0,001 comparado com o grupo LPS (ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls).

## 5.2 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU CLORETO ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO EM RELAÇÃO AO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO NO TESTE DO CAMPO ABERTO

Para investigar se o tratamento preventivo com colecalciferol, cloreto zinco e associação dos compostos têm efeito no comportamento do tipo ansioso nos animais que receberam LPS, os mesmos foram submetidos ao teste de campo aberto, onde foi avaliado o tempo de latência para entrada no centro, tempo total gasto no centro, tempo para latência de autolimpeza e tempo total gasto na autolimpeza.

Conforme mostrado na figura 11A, a ANOVA de duas vias revelou efeito principal da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3,56) = 5,866$ ,  $P < 0,0015$ ] e do LPS [ $F(1,56) = 230,9$ ,  $P < 0,0001$ ], porém para os tratamentos com colecalciferol, cloreto zinco e associação dos compostos não houve efeito significativo [ $F(3,56) = 1,404$ ,  $P = 0,2512$ ]. O teste post-hoc revelou que o LPS causou um aumento significativo no tempo de latência para entrada no centro e os tratamentos com colecalciferol ou cloreto de zinco preveniram esse efeito ( $P < 0,001$ ).

A figura 11B mostra o resultado do tempo total no centro. A ANOVA de duas vias indicou efeitos principal dos tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos [ $F(3,56) = 3,574$ ,  $P < 0,0195$ ], e do LPS [ $F(1,56) = 83,56$ ,  $P < 0,0001$ ], porém não houve efeito da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3,56) = 0,8110$ ,  $P = 0,4932$ ]. O teste post-hoc mostrou que o LPS promoveu uma diminuição significativa no tempo total no centro, quando comparados ao grupo veículo salina ( $P < 0,001$ ).

A figura 11C mostra o tempo de latência para a autolimpeza dos camundongos submetidos ao teste de campo aberto durante 6 minutos. A ANOVA de duas vias indicou efeito principal dos tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos [ $F(3,56) = 3,354$ ,  $P = 0,0252$ ], e do LPS [ $F(1,56) = 26,72$ ,  $P < 0,0001$ ], porém para interação entre os tratamento e LPS não houve diferença significativa [ $F(3,56) = 0,1173$ ,  $P = 0,9496$ ]. O teste post-hoc indicou que o LPS causou um aumento significativo no tempo para latência para a autolimpeza, quando comparados ao grupo veículo salina ( $P < 0,001$ ).

A figura 11D mostra o tempo total de autolimpeza, sendo que a ANOVA de duas vias não indicou efeito principal para os tratamentos com colecalciferol, cloreto de

zinco e associação dos compostos [F (3,56)= 0,2591, P=0,8545] e interação entre os tratamento e LPS [F(3,56)= 1,087, P=0,3622. Entretanto indicou efeito principal do LPS [F (1,56) = 72,68, P<0,0001]. O teste post-hoc evidenciou que o LPS causou um aumento significativo no tempo total para a autolimpeza, quando comparado ao grupo veículo salina (P<0,001).

Figura 11- Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou cloreto de zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação ao comportamento do tipo ansioso no teste do campo aberto

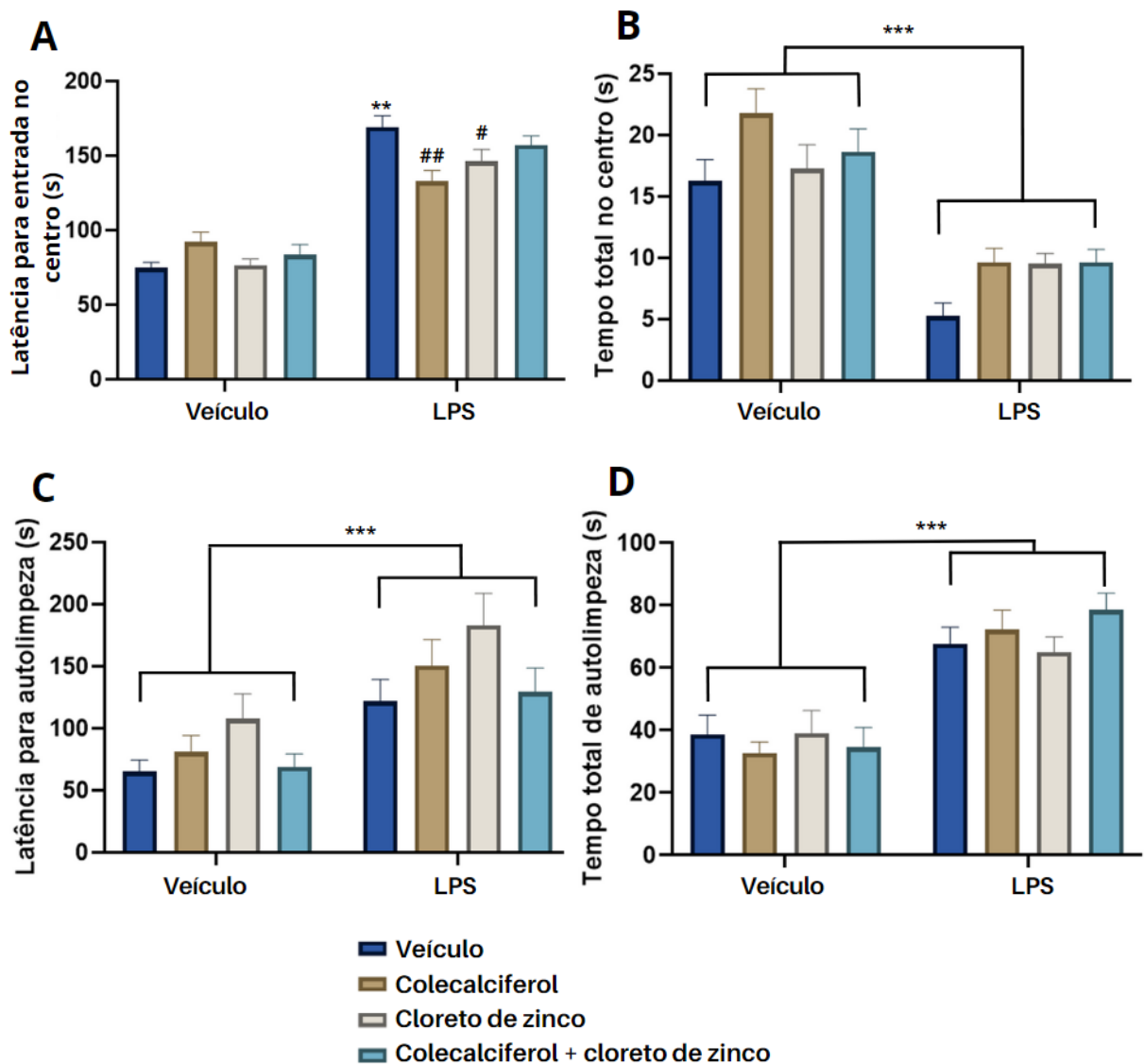


Figura 11: Efeito da administração por 7 dias de colecalciferol (1000 UI/Kg/dia) e/ou cloreto de zinco (10 mg/kg/dia) e posterior administração de LPS (0,5 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência para entrada no centro (A), tempo total no centro (B), tempo de latência para autolimpeza (C) e tempo total de autolimpeza no campo aberto (D). Os valores são expressos como médias  $\pm$  S.E.M (n = 8). \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 comparado com o grupo veículo; # P < 0,05, ## P < 0,01 comparado com o grupo LPS; (ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

### 5.3 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU CLORETO DE ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NO TESTE DE BORRIFAGEM DE SACAROSE

A figura 12A mostra o resultado dos comportamentos de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose, o primeiro parâmetro a ser analisado é o tempo de latência para a autolimpeza. A ANOVA de duas vias revelou efeito principal dos tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos [ $F(3, 56) = 3,389$ ,  $P=0,0241$ ], do LPS [ $F(1, 56) = 5,222$ ,  $P=0,0261$ ] e da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3, 56) = 4,828$ ,  $P=0,0046$ ] no teste de borrifagem de sacarose. A análise post-hoc revelou que os animais tratados com LPS apresentaram um tempo maior de latência em relação ao grupo veículo salina ( $P<0,01$ ), sendo este efeito prevenido pelos tratamentos ( $P<0,01$ ).

A figura 12B mostra o tempo total de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose. A ANOVA de duas vias não indicou efeito principal do LPS [ $F(1, 56) = 2,868$ ,  $P=0,0959$ ], contudo indicou efeito principal dos tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco, colecalciferol e cloreto de zinco [ $F(3, 56) = 3,518$ ,  $P= 0,0208$ ] e da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3, 56) = 3,921$ ,  $P= 0,0130$ ]. Análise post-hoc revelou que os animais tratados com LPS apresentaram um tempo menor de autolimpeza em relação ao grupo veículo salina ( $P<0,01$ ), contudo os tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos preveniram este efeito ( $P<0,01$ ).

Figura 12- Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou cloreto de zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação ao índice de autocuidado e comportamento motivacional no teste de borrifagem de sacarose

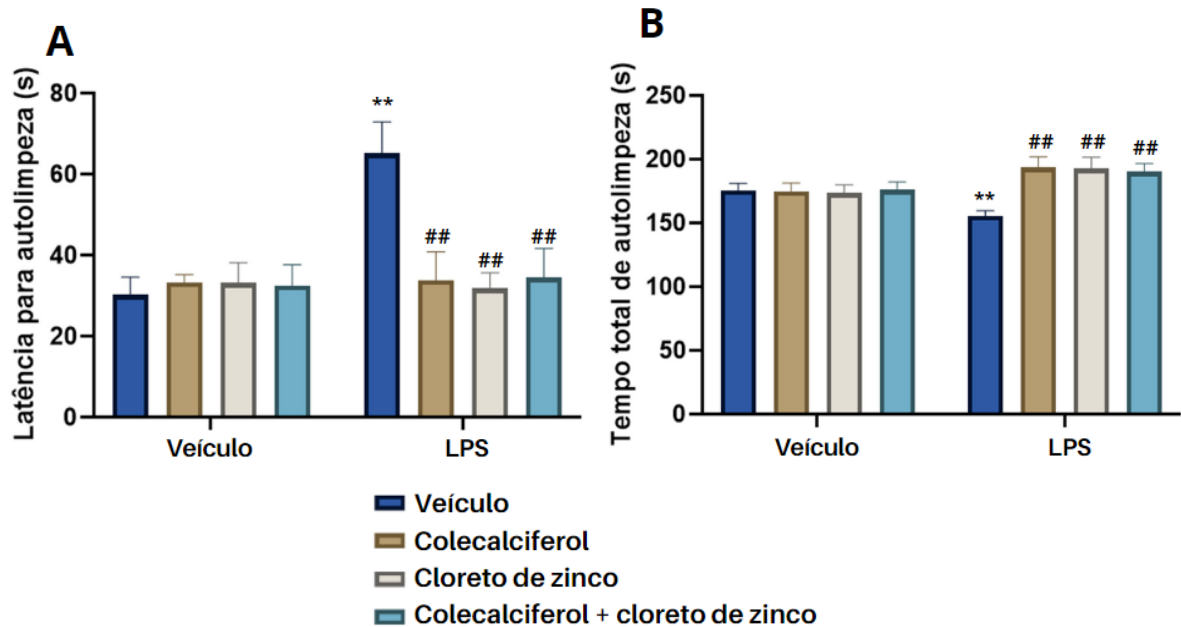


Figura 12: Efeito da administração por 7 dias de colecalciferol (1000 UI/Kg/dia), de cloreto de zinco (10 mg/kg/dia) e posterior administração de LPS (0,5 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência para a autolimpeza (A) e o tempo total de autolimpeza (B) no teste de borrifagem de sacarose. Os valores são expressos como médias  $\pm$  S.E.M (n = 8). \*\* P < 0,01 comparado com o grupo veículo; ## P < 0,01 comparado com o grupo LPS; (ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

#### 5.4 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU CLORETO DE ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TBARS

A figura 13 mostra o resultado da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, dos quais o principal é o malondialdeído (MDA). A ANOVA de duas vias mostrou efeito principal dos tratamentos com colesterciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos [ $F(3, 56) = 4,920, P < 0,001$ ], do LPS [ $F(1, 56) = 38,96, P < 0,0001$ ] e da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3, 56) = 4,335, P < 0,01$ ]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que o LPS aumentou significativamente os níveis corticais de TBARS e que este efeito foi prevenido pelo tratamento realizado por 7 dias com colesterciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos ( $P < 0,01$ ).

Figura 13- Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colesterciferol e/ou cloreto de zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação a determinação dos níveis de TBARS

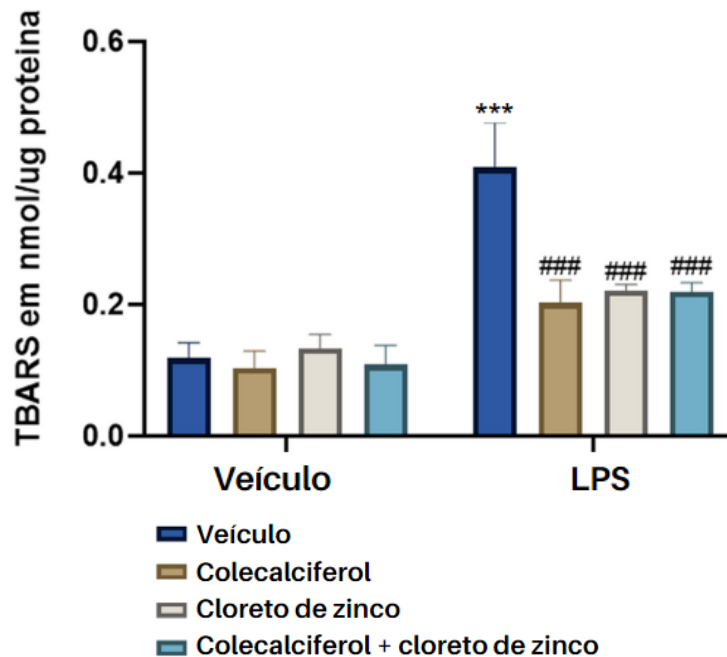


Figura 13: Efeito da administração por 7 dias de colesterciferol (1000 UI/Kg/dia), e/ou cloreto de zinco (10 mg/kg/dia) e posterior administração de LPS (0,5 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex pré-frontal de camundongos. Os valores são expressos como médias  $\pm$  S.E.M ( $n = 8$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  comparado com o grupo veículo; ###  $P < 0,001$  comparados com o grupo LPS; (ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

## 5.5 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU CLORETO DE ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TIÓIS NÃO-PROTEICOS (GLUTATIONA-REDUZIDA- GSH)

A figura 14 mostra o resultado da determinação dos níveis de tióis não-proteicos (majoritariamente GSH). A ANOVA de duas vias revelou efeito principal dos tratamentos com colestalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos [ $F(3, 56) = 11,51, P < 0,001$ ] e da interação entre os tratamentos e o LPS [ $F(3, 56) = 8,742, P < 0,001$ ], mas sem efeito principal do LPS [ $F(1, 56) = 0,9579, P = 0,3326$ ]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que a administração de LPS causou uma redução significativa neste parâmetro bioquímico e que o tratamento preventivo realizado por 7 dias com colestalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos aumentou significativamente os níveis de GSH em relação ao LPS, ou seja, preveniu o efeito do LPS ( $P < 0,001$ ).

Figura 14: Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colestalciferol e/ou cloreto de zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação a determinação dos níveis de Tióis Não-proteicos (GSH)

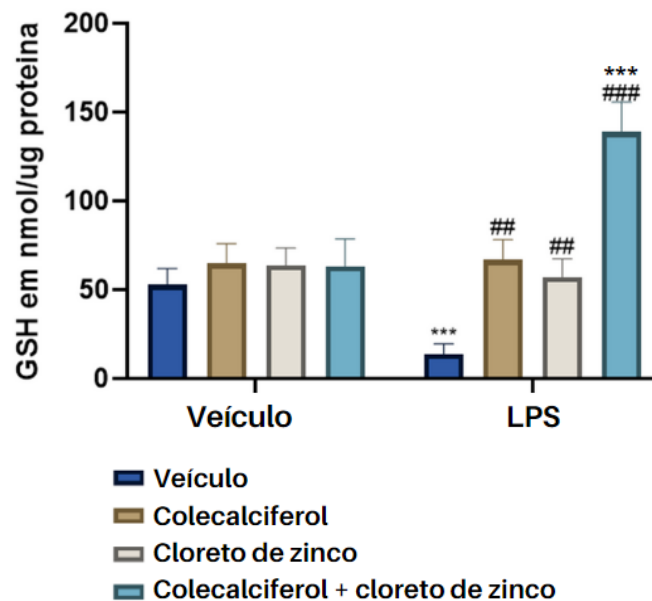


Figura 14: Efeito da administração por 7 dias de colestalciferol (1000 UI/Kg/dia) e/ou cloreto de zinco (10 mg/kg/dia) e posterior administração de LPS (0,5 mg/kg, i.p.) nos níveis de Tióis não-proteicos (GSH). Os valores são expressos como médias  $\pm$  S.E.M ( $n = 8$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  comparado com o grupo veículo; \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  comparado com o grupo LPS; (ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

## 5.6 EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM COLECALCIFEROL E/OU CLORETO DE ZINCO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE LPS OU VEÍCULO NOS NÍVEIS DE NO<sub>x</sub>

A figura 15 mostra o resultado da determinação dos níveis de NO<sub>x</sub> no córtex pré-frontal. A ANOVA de duas vias indicou efeito principal dos tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos [F (3, 56) = 5,638, P<0,01], da interação entre os tratamentos e o LPS [F (3, 56) = 5,799, P<0,01], porém não indicou efeito principal do LPS [F (1, 56) = 0,8510, P=0,3639]. O teste post hoc de Newman-Keuls indicou que o LPS aumentou significativamente (P<0,01) os níveis de NO<sub>x</sub> em relação ao veículo e o tratamento preventivo realizado por 7 dias com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos preveniu este efeito do LPS (P<0,01).

Figura 15: Efeito do tratamento preventivo por 7 dias de colecalciferol e/ou cloreto de zinco em camundongos submetidos a uma única administração de LPS em relação a determinação dos níveis de NO<sub>x</sub>

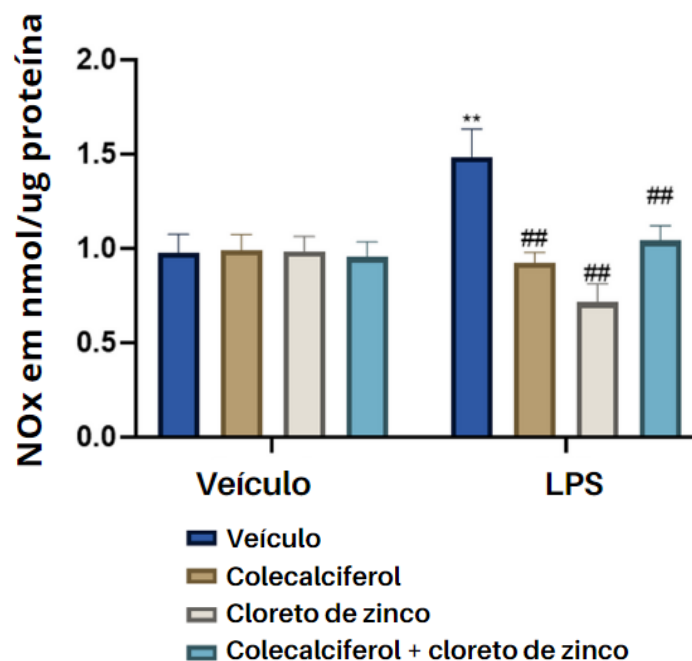


Figura 14: Efeito da administração por 7 dias de colecalciferol (100 UI/Kg/dia), e/ou zinco (10 mg/kg/dia) e posterior administração de LPS (0,5 mg/kg, i.p.) nos níveis de NO<sub>x</sub> no córtex pré-frontal de camundongos. Os valores são expressos como médias ± S.E.M (n = 8). \*\* P < 0,01 comparado com o grupo veículo; ## P < 0,01 comparado com o grupo LPS; (ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).



## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos pela primeira vez em animais, o efeito do tratamento preventivo utilizando o colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos no modelo inflamatório de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS (24h após o último tratamento) em tarefas que avaliam o comportamento do tipo depressivo e ansioso nos testes de suspensão pela cauda, campo aberto e borrifagem de sacarose, além dos parâmetros de estresse oxidativo em camundongos. De fato, o tratamento preventivo de sete dias com colecalciferol, cloreto de zinco e sua associação foram capazes de reverter o comportamento do tipo-depressivo e as alterações cerebrais pró-oxidativas.

Como já mencionado anteriormente o LPS é uma molécula que está presente na membrana externa das bactérias gram-negativas que ativa o sistema imune inato, e quando administrado sistemicamente reproduz um modelo do tipo depressivo por neuroinflamação, desencadeando alterações imunes envolvidas nesse distúrbio como: diminuição dos níveis de zinco que está relacionado à resposta imune/inflamatória alterada, diminuição nos níveis de antioxidantes, aumento nas vias do estresse oxidativo e nitrosativo (O&NS) (Tomaz, 2014), aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de afetar os parâmetros comportamentais como anedonia, comportamentos semelhantes ao desespero e relacionados à ansiedade (Custódio et al., 2013; Mello et al., 2018). Ademais, a literatura mostra que o LPS quando administrado em uma única dose pode aumentar o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda em camundongos machos (ZHIMAN LI, 2020) e fêmeas (Jiang et al., 2021). Nesse contexto, evidenciamos que a administração de LPS aumentou o tempo de imobilidade no TSC caracterizando um comportamento do tipo depressivo nos animais, porém o colecalciferol, o cloreto de zinco e a associação de ambos foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade dos animais no teste, sugerindo que os tratamentos causaram um efeito do tipo-antidepressivo. Corroborando com esses resultados estudos anteriores que utilizaram a vitamina D3 (Neis, et al., 2022) e o zinco (Manosso, et al., 2017) de maneira isolada, produziram um efeito tipo antidepressivo no TSC em camundongos. Ressalta-se que nosso estudo indicou que o tratamento preventivo realizado por sete dias com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos diminuíram significativamente o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste de

suspensão da cauda quando comparados ao controle tratado com veículo, contudo, quando associado os dois compostos não se obteve um efeito antidepressivo sinérgico. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que utilizaram análogos dos compostos, como o tratamento preventivo com nanopartículas óxido de zinco por 16 dias (Xie, et al, 2012), e o tratamento preventivo por 14 dias com paricalcitol (He et al., 2019) causaram menor tempo de imobilidade no TSC em animais submetidos ao desafio do LPS.

O teste do campo aberto tem como objetivo eliminar a possibilidade de que alterações no tempo de imobilidade no TSC ocorram devidos a uma modificação na atividade locomotora dos animais causada pelos compostos (CRAWLEY, GOODWIN; 1980). Além disso a avaliação da atividade locomotora é relevante para avaliar se o animal submetido à administração de LPS apresenta o comportamento doentio temporário (*sickness behavior*) que é causado pela administração sistêmica de LPS nas primeiras horas após a sua administração (Sens et al., 2017). Este comportamento doentio é caracterizado por alterações neuroimunes e adaptativas adotadas pelo hospedeiro, atacar os patógenos invasores e recuperar-se, reduzindo a exposição do animal doente à infecção. Para que a ocorrência desse comportamento fosse descartada, a atividade locomotora espontânea dos animais foi avaliada pela análise de distância total percorrida, no teste de campo aberto 24 h após a administração do LPS (Li, et al, 2021a). Ressalta-se que vários experimentos com camundongos e ratos relataram que o comportamento do tipo depressivo está presente sem os efeitos de *sickness behavior* após 24h da administração do LPS (Frenois et al., 2007, Henry et al., 2008, O'connor et al., 2009, Ge, 2015). Dessa forma nosso estudo mostrou que a administração de LPS (24h antes do teste) e os tratamentos com colecalciferol e cloreto de zinco e associação dos compostos, não alteraram a atividade locomotora como já evidenciado em alguns estudos (Liu et al, 2018; Li et al, 2021b, Jiang, 2021). Portanto, conclui-se que não ocorreu uma redução da atividade locomotora que poderia ter afetado a mobilidade dos animais no TSC, causando um falso resultado de comportamento depressivo dos animais nesse teste. Sendo assim, valida-se que a resposta comportamental no TSC apresentada pelos animais submetidos ao LPS pode ser considerada um comportamento do tipo depressivo.

O campo aberto também pode ser utilizado para avaliar transtornos de ansiedade, considerando o tempo gasto com a exploração do espaço. Kopp et al

(1997) relataram que os animais preferem a parte mais periférica do aparato do que a parte central, esse comportamento foi chamado de tigmotaxia. Portanto a diminuição do tempo gasto na parte central e a aumento da latência para entrar no centro podem ser indícios de ansiedade nos animais (Prut, Belzung, 2023). Dessa forma foram avaliados parâmetros comportamentais indicativos de comportamento ansioso, dentre eles, a diminuição do tempo no centro do aparato e aumento o tempo de latência para entrada no centro do campo aberto. Os resultados sugerem que o LPS pode induzir o comportamento do tipo ansioso, pois causou um aumento significativo para a latência na entrada do centro, sugerindo que os animais estavam mais ansiosos e relutantes para explorar o ambiente, contudo os tratamentos com colecalciferol ou cloreto de zinco conseguiram atenuar esses efeitos. Os camundongos tratados com LPS também apresentaram um menor tempo no centro do aparato quando comparado ao grupo controle salina, corroborando com o resultado anterior, mostrando os animais apresentam o comportamento do tipo ansioso induzido pelo LPS. Enfatizando esse resultado estudos sugeriram que animais machos e fêmeas tratados com LPS tem maior tempo para latência e menor tempo gasto no centro do campo em relação aos camundongos tratados com solução salina (Cordeiro et al; 2019; Fields, et al, 2018; Murray, et al, 2019). Contudo em relação a este parâmetro não houve um efeito significativo do colecalciferol e do cloreto de zinco em atenuar o comportamento do tipo ansioso induzido por LPS.

Outro parâmetro importante que é analisado no campo aberto é a autolimpeza (*grooming*). Normalmente os animais realizam esse comportamento para a higienização da superfície corporal, entretanto, essa ação auxilia na termorregulação, interação social e redução do estresse (Smolinsky et al, 2009). Desde os anos 80 muitos estudos vêm mostrando que este comportamento mostra a sensibilidade da ação dos fármacos ansiolíticos (Crawley et al, 1983; Moody et al, 1988) e ansiogênicos (Ferré et al, 2008; Nosek et al, 2008). Porém esse parâmetro deve ser analisado de forma quantitativa e qualitativa, mas tipicamente a análise desse comportamento é feita apenas de forma quantitativa, não sendo suficiente para diagnosticar o comportamento do tipo ansioso e de estresse, pois estes dados são utilizados em conjunto com outros parâmetros (Kalueff; Tuohimaa, 2004; Kalueff; Tuohimaa, 2005, Kallueff et al, 2007). Como mostra nosso estudo, os animais tratados com LPS levaram mais tempo para iniciar a autolimpeza e dispenderam mais tempo se autolimpando do que os animais do grupo controle salina, caracterizando um

comportamento do tipo ansioso. Embasando nossos resultados estudos mostram que o tratamento com LPS pode aumentar a latência e o tempo total de autolimpeza nos animais tanto machos (Bassi, et al, 2011; Cristino 2022) quanto fêmeas (Mello, 2018). Entretanto os tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos não foram capazes de prevenir o comportamento do tipo ansioso induzido pelo LPS. Mas existem alguns estudos em que esses compostos usados de maneira e isolada conseguiram o efeito de prevenção do comportamento do tipo ansioso, como Gammoh e colaboradores (2023) evidenciaram que o tratamento com vitamina D 1200UI/kg durante 7 dias em um modelo de estresse, e Kirsten e colaboradores (2020) utilizando o modelo animal de ratos Wistar-Han o sulfato de zinco na dose de 2 mg/kg/dia, durante 3 dias. Dessa maneira, podemos supor que esses compostos podem apresentar efeitos ansiolíticos em outros protocolos experimentais (usando diferentes doses e desenho experimental). A realização de um teste adicional de comportamento de ansiedade e a análise qualitativa devem ser estudadas futuramente para investigar os possíveis efeitos ansiolíticos do zinco e da vitamina D.

Avaliações comportamentais do teste de preferência por sacarose são comumente usados para avaliar as características do tipo-depressivo em roedores, sendo que um prejuízo na preferência por sacarose é um indicativo de déficits motivacionais e comportamento anedônico, sendo esta uma característica da depressão (Tomaz, et al., 2014). Ainda, animais submetidos a protocolos de indução de depressão pela administração de uma única dose de LPS podem apresentar um comportamento do tipo-anedônico evidenciado pelo aumento da latência e redução do tempo de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose (Souza, et al, 2019). Portanto nossos resultados mostram que 24h após a administração de LPS, os animais apresentaram um maior tempo para a latência e menor tempo de total de autolimpeza quando comparados ao controle salina, caracterizando um comportamento tipo depressivo e os tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação preveniram esse comportamento. Corroborando esses resultados, estudos mostram que tanto animais machos (Sens, et al, 2017; Casaril, et al, 2019; Souza, et al, 2019) quanto fêmeas (Lieberknecht et al, 2017; Sens, et al, 2017) tratados com LPS tiveram maior tempo para latência e menor tempo gasto na autolimpeza em relação aos camundongos tratados com solução salina. Em relação ao tratamento com zinco um estudo de Misztak e colaboradores (2021) demonstrou que a suplementação de zinco (10 mg/kg/dia) por 14 dias após o protocolo de estresse

crônico de 28 dias conseguiu normalizar o aumento da latência para a autolimpeza e aumentou o tempo total de autolimpeza em camundongos machos. Por fim um dos estudos do nosso grupo evidenciou que o tratamento preventivo por 7 dias com colecalciferol (2,5 µg/kg) em camundongos machos no protocolo de administração de corticosterona por 21 dias, conseguiu prevenir o comportamento anedônico causado pelo modelo (Camargo et al, 2020).

Nos parâmetros bioquímicos, o estresse oxidativo e o processo inflamatório estão relacionados. As células inflamatórias liberam espécies reativas de oxigênio no local da inflamação, levando a um estresse oxidativo exagerado (Mello, et al, 2018). Dessa maneira sugeriu-se uma relação entre o estresse oxidativo e as alterações comportamentais, incluindo a depressão e os comportamentos do tipo ansioso (Beheshti, et al., 2020). Dessa forma em nosso estudo avaliamos os parâmetros de estresse oxidativo como: os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA) no córtex pré-frontal, uma estrutura encefálica relevante para a regulação do humor, a fim de elucidar os mecanismos que estão envolvidos nos comportamentos do tipo antidepressivo do colecalciferol e do cloreto de zinco exibido nos testes comportamentais.

A peroxidação lipídica é um processo oxidativo realizado por espécies reativas de oxigênio contra os fosfolipídios e ácidos graxos insaturados nas membranas celulares, prejudicando excessivamente função da membrana, aumentando a rigidez e levando ao extravasamento de íons cálcio (Fuchs, et al., 2014). O malondialdeído (MDA) é um produto de peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados e ácido araquidônico, que tem sido usado como um parâmetro de peroxidação lipídica (Gaweł, et al., 2004). A peroxidação lipídica, inferida por maiores níveis de MDA em roedores, tem sido evidenciada em estudos nos quais os animais apresentam comportamentos depressivos e ansiosos (Jangra, et al. 2014; Mello, et al., 2018; Tomaz, et al, 2014; Beheshti, et al., 2020). Nossos resultados evidenciaram que a administração sistêmica de LPS causou um aumento nos níveis de MDA, provocando um estado de estresse oxidativo, e os tratamentos preventivos realizado por sete dias com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos diminuíram significativamente os níveis de MDA em relação ao LPS. Consistente com esses resultados, foi relatado anteriormente que o LPS aumenta os níveis de MDA no córtex pré-frontal em camundongos machos, e a administração de imipramina, L -arginina, sildenafil, L -NAME e aminoguanidina preveniu este efeito

(Tomaz, et al., 2014). Além disso, o pré-tratamento com mangiferina mostrou um aumento significativo do nível de GSH no córtex pré-frontal quando comparado com o grupo tratado com LPS (Jangra, et al., 2014). Em um outro estudo que utilizou camundongos machos e fêmeas que receberam administração de LPS, os machos apresentaram níveis aumentados de MDA no hipocampo, enquanto as fêmeas apresentaram níveis aumentados de MDA apenas no hipotálamo (Mello, et al., 2018). Em um estudo realizado por nosso grupo utilizando camundongos Swiss fêmeas no protocolo de estresse de contenção por 7 horas, houve um aumento de MDA nas regiões do córtex e hipocampo (Moretti, et al., 2013). Já no estudo realizada com ratos Wistar machos no protocolo de estresse leve crônico imprevisível, houve um aumento do nível de MDA no córtex do grupo submetido ao estresse em comparação com o grupo controle e a vitamina D administrada na dose de 100 UI/kg/dia por 28 dias diminuiu os níveis de MDA (Bakhtiari-Dovvombaygi, et al., 2021). Com relação ao zinco um estudo realizado com ratas Wistar fêmeas no protocolo de indução do comportamento do tipo depressivo com o pesticida organofosforado malathion, houve aumento significativo dos níveis de MDA no córtex cerebral de ratas tratados com malathion, que foi revertido pelo tratamento com zinco (Brocardo, et al., 2007).

Um parâmetro de defesa antioxidante não enzimática que analisamos foram os tióis não proteicos, dos quais a maior parte é a glutathiona reduzida (GSH). Diversos estudos têm demonstrado níveis baixos de GSH e prejuízo nas atividades das enzimas envolvidas na síntese e restauração de GSH, em pacientes com depressão (Gawryluk, et al., 2011; Maes et al., 2011b). Podemos considerar que o GSH é o tiol mais numeroso do sistema antioxidante endógeno, ele está presente nas células de mamíferos, protegendo-as contra os EROs produzidos pela cadeia respiratória mitocondrial (Dringen e Hirrlinger, 2003). Vários estudos pré-clínicos relatam que animais submetidos a diversos modelos ambientais de estresse e farmacológicos apresentam uma diminuição expressiva dos níveis de GSH nas áreas cerebrais que estão relacionadas com a regulação de humor como o córtex pré-frontal (Silva, et al., 2016; Tao, et al., 2016; Todorović e Filipovic, 2017). Em nossa pesquisa, observamos que o protocolo com LPS diminuiu os níveis de GSH, e que os tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos aumentaram os níveis de GSH em relação ao grupo LPS. Consistentemente, com nossos achados, foi reportado que a administração de LPS pode diminuir os níveis de GSH no córtex pré-frontal de camundongos machos e fêmeas e um aumento dependente do sexo e da

região cerebral na peroxidação lipídica (Mello et al.; 2018). Muitos estudos vêm evidenciado dano oxidativo a nível de peroxidação lipídica e perdas no sistema antioxidante, como a redução dos níveis de GSH, no cérebro de animais machos submetidos à administração de LPS (Custódio et al., 2013; Mello et al., 2013; Sayd et al., 2014). Corroborando como nossos resultados Tomaz e colaboradores (2014) utilizando o protocolo de desafio de LPS em camungongos machos, nos tecidos do córtex cerebral e hipocampo observaram níveis diminuídos de GSH em animais tratados com LPS, e a aminoguanidina foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis de GSH no córtex pré-frontal e a imipramina e o sildenafil preveniram as diminuições dos níveis de GSH no hipocampo. Jangra e colaboradores (2014) também tiveram um resultado semelhante utilizando a mangiferina (40 mg/kg, po) como tratamento. Já em um estudo com camundongos fêmeas submetidas ao desafio de LPS, houve uma diminuição dos níveis de GSH no córtex pré-frontal quando comparado com o controle (Mello, et al., 2018). Além disso, no modelo de indução do comportamento do tipo depressivo pela administração de corticosterona por 21 dias, os camundongos Swiss fêmeas tiveram níveis baixos de GSH na região do hipocampo (Silva et al., 2016). Já no modelo de estresse crônico leve imprevisível, camundongos machos apresentaram a concentração diminuída de glutathione e o tratamento com sesamol aboliu este efeito (Kumar et al., 2011). Em outros estudos com o protocolo de estresse crônico leve imprevisível, em ratos Wistar machos, os resultados mostram os níveis reduzidos de GSH no córtex pré-frontal, e a administração de vitamina D na dose 10.000 UI/kg/dia, por 28 dias conseguiu prevenir a diminuição desses níveis (Bakhtiari-Dovvombaygi, et al., 2021). Com o estudo utilizando o zinco, em ratos Wistar machos, nos tratamentos de zinco durante 7 dias não houve alteração nos níveis de GSH, porém, quando tratados cronicamente com zinco (300 mg/L, vo) durante 30 dias mostrou ser eficaz aumentando o conteúdo de GSH no hipocampo e córtex cerebral (Franco et al., 2008).

Muitas vias de sinalização participam do efeito tipo-depressivo em roedores, uma delas é a via do Óxido Nítrico (NO). A formação de NO no cérebro está ligada há atividade glutamatérgica envolvendo a ativação de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA. A ativação destes receptores favorece o influxo de  $Ca^{2+}$ , ativando o complexo cálcio-calmodulina, que ativa a isoforma neuronal da NOS (nNOS), propiciando a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO (Bredt et al., 1991; Garthwaite E Boulton, 1995). A superativação da via L-arginina/NOS/NO e consequentemente o aumento de NO ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs),

induzindo a respostas fisiopatológicas como excitabilidade neuronal, plasticidade sináptica, modulação da liberação do neurotransmissor, aprendizagem, processos de memória, processo de neuroinflamação e neurotoxicidade envolvidos no estresse e na depressão (Garthwaite E Boulton, 1995; Garthwaite, 2008; Steinert et al., 2010; East E Garthwaite, 1991; chen, et al., 2015, dhir e Kulkarni, 2011 ). Alguns estudos evidenciaram que os níveis aumentados de NO pode levar a danos oxidativos como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e tióis (Luperchio, Tamir, Tannenbaum, 1996). Ademais os níveis aumentados de NO pode ser devido ao aumento da atividade de iNOS, e quando inibida essa enzima pode-se amenizar o dano oxidativo e a inflamação (Abdel-Zaher, et al., 2017; Tabrizian, et al., 2016; Anaeigoudari, et al., 2016). Diante disso, previu-se que o comportamento do tipo depressivo e ansiedade desafiado pelo LPS, e acompanhado por danos oxidativos no córtex cerebral, pode ocorrer pelo aumento de NO consecutivo ao aumento da atividade da iNOS. Corroborando com esses dados, em um estudo realizado por Abdel-Zaher e colaboradores (2017), o desafio do LPS vem acompanhado pela diminuição do nível de concentração de glutathiona e aumento dos níveis de peroxidação lipídica e nitrito no córtex pré-frontal. Portanto, considerando que o NO é instável e rapidamente oxidado a nitrato e nitrito após sua produção, nosso estudo mensurou os níveis de Nox. Mostramos que os camundongos submetidos ao desafio do LPS apresentaram um aumento dos níveis de NOx, e o tratamento preventivo realizado por sete dias com colecalciferol, cloreto de zinco e a associação dos compostos conseguiram prevenir esse aumento causado pelo LPS. De acordo com nossos resultados, outros pesquisadores demonstraram que a administração do LPS pode aumentar os níveis de NO em roedores, e quando tratados com agmatina na dose de 100 e 150 mg/kg/dia por cinco semanas os ratos Wistar machos tiveram esse nível reduzido (Beheshti, et al. 2020). Em outro estudo utilizando camundongos machos o nível de nitrito aumentou tanto em hipocampo quanto no córtex pré-frontal após 24 h de exposição ao LPS quando comparado ao grupo de controle e o pré-tratamento com mangiferina preveniu o aumento induzido por LPS no nível de NO nas duas regiões (Jangra, et al., 2014). No protocolo de estresse crônico realizado em camundongos machos a concentração de NO no soro foi maior no grupo estressado em comparação ao controle, e os níveis de NO normalizaram em todos os grupos tratados com escitalopram, ácido ascórbico, vitamina D (1.200 UI/kg/semana) ou diazepam por sete dias (GAMMOH, et al., 2023). Em um outro estudo utilizando células da linhagem BV2



de células da micróglia de camundongo e a linhagem de células neuronais do hipocampo de camundongo HT-22, e tratando com zinco (10  $\mu\text{M}$  e 30  $\mu\text{M}$ ) 1 h antes da adição de LPS (100 ng/ml), houve o aumento da expressão de iNOS pelo LPS, mas este efeito foi abolido pelo zinco nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 30  $\mu\text{M}$  (Hongxia, et al., 2019).

Ao que tudo indica nosso estudo foi o primeiro a avaliar o tratamento preventivo com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos no modelo de indução do comportamento do tipo depressivo e ansioso pelo desafio do LPS, avaliando parâmetros de estresse oxidativo em camundongos fêmeas. Dessa forma não existem estudos com os dois compostos usados em associação para corroborar com nossa pesquisa, porém estudos utilizando os compostos de forma isolada tem mostrado a eficácia dos tratamentos em relação ao comportamento do tipo depressivo e nos parâmetros bioquímicos. Nosso estudo tem algumas limitações, uma delas é a avaliação de uma única estrutura cerebral (córtex pré-frontal), seria de grande importância avaliar também o hipocampo, pois muitos estudos vêm demonstrado o envolvimento dessa estrutura no comportamento do tipo-depressivo e ansioso (Otte et al., 2016). Embora tenhamos obtido resultados promissores com esse modelo animal utilizando fêmeas seria de grande valia realizar uma comparação com animais do sexo oposto, visto que existem poucos estudos com as fêmeas, e as mesmas apresentam resiliência para o LPS, como Mello e colaboradores (2018) mostraram no teste de nado forçado que as fêmeas não tiveram o aumento do tempo de imobilidade quando comparados aos machos no desafio do LPS. Outro ponto a ser destacado é em relação a autolimpeza onde somente as fêmeas apresentaram um aumento neste parâmetro, mostrando que animais de sexo diferentes assim como os seres humanos apresentam comportamento diferenciado para o TDM.

## 7 CONCLUSÃO

Os pré-tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos por sete dias foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade no TSC tanto dos animais tratados com veículo (controle) como os submetidos ao desafio inflamatório pelo LPS, caracterizando um efeito tipo antidepressivo profiláticos destes tratamentos, porém a associação dos compostos não teve um efeito sinérgico.

O comportamento do tipo ansioso induzido pelo LPS evidenciado pelo aumento da latência e diminuição do tempo de centro do campo aberto, bem como diminuição da latência de autolimpeza e aumento da autolimpeza não foram prevenidos pelo tratamento de sete dias com colecalciferol e zinco.

O déficit do comportamento motivacional e anedônico foram revertidos com os tratamentos com colecalciferol, cloreto de zinco e associação dos compostos no TBS.

De acordo com os resultados dos parâmetros bioquímicos, aparentemente o estresse oxidativo (em relação ao MDA e GSH) no córtex pré-frontal está presente nos animais que foram desafiados com LPS, e os tratamentos foram eficazes para prevenção desta alteração, mas outros estudos devem ser realizados para avaliação de outras estruturas cerebrais no sentido de verificar se esse protocolo experimental é válido para as outras regiões envolvidas na depressão. Além disso, um aumento dos níveis de nitrato e nitrito fornecem uma inferência de maior nível de NO no córtex pré-frontal dos animais desafiados com LPS. Possivelmente esta alteração está envolvida no comportamento do tipo depressivo observado nos testes comportamentais de TSC e TBS, sendo o colecalciferol e zinco efetivos em prevenir esta alteração.

Portanto os tratamentos com colecalciferol, zinco e associação dos compostos realizados por sete dias são capazes de prevenir o comportamento do tipo depressivo induzido por um desafio inflamatório em camundongos, porém para melhor elucidar quais mecanismos estão envolvidos, novos estudos devem ser realizados, avaliando outras estruturas encefálicas como também outros parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-ZAHER, A. O. *et al.* A potential mechanism for the ameliorative effect of thymoquinone on pentylentetrazole-induced kindling and cognitive impairments in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 88, p. 553-561, abr. 2017.
- ADZIC, M. *et al.* The contribution of hypothalamic neuroendocrine, neuroplastic and neuroinflammatory processes to lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in female and male rats: involvement of glucocorticoid receptor and c/ebp- $\beta$ . **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 291, p. 130-139, set. 2015.
- AHN, S.T. *et al.* 196 The Efficacy of Vitamin D/Zinc Supplementation on Erectile Dysfunction: a 3-month pilot study. **The Journal of Sexual Medicine**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 96-97, abr. 2019.
- ALMEIDA, D. B. *et al.* A relação entre marcadores inflamatórios e depressão: uma revisão da literatura. **Scire Salutis**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 84-97, 21 set. 2020.
- ALMEIDA, L. K. M. L. *et al.* Vitamin D (VD3) antioxidative and anti-inflammatory activities: Peripheral and central effects. *Eur J Pharmacol.*, 2020.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico de Transtornos mentais: DSM-5**. 5a Ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2015.
- AMOS, A., RAZZAQUE, M.S. Zinc and its role in vitamin D function. **Curr Res Physiol**. v. ;5, p. 203-207, 2022.
- ANAEIGOUDARI, A.; SOUKHTANLOO, Mohammad; REISI, Parham; BEHESHTI, Farimah; HOSSEINI, Mahmoud. Inducible nitric oxide inhibitor aminoguanidine, ameliorates deleterious effects of lipopolysaccharide on memory and long term potentiation in rat. **Life Sciences**, [S.L.], v. 158, p. 22-30, ago. 2016.
- ANDERSON, I.M..Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. **Journal of Affective Disorders**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 19-36, abr. 2000.
- ANDREAZZA, A. C. *et al.* Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, [S.L.], v. 111, n. 2-3, p. 135-144, dez. 2008.
- ANDREWS, P. W. Is serotonin an upper or a downer ? The functional role of serotonin in depression and a possible mechanism of antidepressant action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 51, p. 1-45, 2015.
- ANDRIOLLI, T. V. **Concentrações séricas de 25 hidroxivitamina D em mulheres acima de 35 anos**: prevalência de valores considerados como normais e fatores associados. 2018. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.6.2018.tde-22082018-155512. Acesso em: 2021-05-05
- ANSCHAU, V.; IAGUER, F. Avaliação da taxa de peroxidação lipídica em ratos

suplementados com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 17-30, 2011.

APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and impact of reactive oxygen species on the testis. **Journal Reprod infertile**, v. 14, p.158-172, 2013.

ARMADA-MOREIRA, A. et al. Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, p. 90, 2020.

BAKHTIARI-DOVVOMBAYGI, H. *et al.* Beneficial effects of vitamin D on anxiety and depression-like behaviors induced by unpredictable chronic mild stress by suppression of brain oxidative stress and neuroinflammation in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S.L.], v. 394, n. 4, p. 655-667, 27 out. 2020.

BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C.. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide from Activated Glia-Inhibiting Neuronal Respiration, Causing Glutamate Release and Excitotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 21, n. 17, p. 6480-6491, 1 set. 2001.

BAO, B. et al. Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 91, n. 6, p. 1634-1641, 28 abr. 2010.

BARBOSA, F. M. et al. Depressive behavior induced by unpredictable chronic mild stress increases dentin hypersensitivity in rats. **Archives of Oral Biology**, [S.L.], v. 80, p. 164-174, ago. 2017.

BASSI, G. S. *et al.* Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behaviour Evaluated in Different Models of Anxiety and Innate Fear in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 110, n. 4, p. 359-369, 2 dez. 2011.

BAUER, M. E.; TEIXEIRA, A. L. Inflammation in psychiatric disorders: what comes first?. **Annals of The New York Academy of Sciences**, [S.L.], v. 1437, n. 1, p. 57-67, 11 maio 2019.

BAY-RICHTER, C. et al. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 222, n. 1, p. 193-199, set. 2011.

BEHESHTI, F. et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in depression- and anxiety-like behaviors chronically induced by lipopolysaccharide in rats: evidence from inflammation and oxidative stress. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 392, p. 112720, ago. 2020.

BERENDJI, D. et al. Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. **Febs Letters**, [S.L.], v. 405, n. 1, p. 37-41, 17 mar. 1997.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 137-151, fev. 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista Nutrição Campinas**, p. 123-130, 1999.

BILBO, S. D.; SCHWARZ, J. M. The immune system and developmental programming of brain and behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 267-286, ago. 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.

BLANCHARD Carolina D, BLANCHARD Robert J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology** v.39(1), p. 43-68. 1988.

BRADLEY, Jr. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, [S.L.], v. 214, n. 2, p. 149-160, jan. 2008.

BRANDÃO, Marcelo L. (2008). As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à neurociência. Livro eletrônico, acesso na homepage do CNPq: [www.cnpq.br](http://www.cnpq.br).

BRETT, D. S., C. E. GLATT, et al. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron**, v.7, n.4, p.615-624, 1991.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p. 3-11, 1992.

BROCARD, P. S. et al. Zinc Attenuates Malathion-Induced Depressant-like Behavior and Confers Neuroprotection in the Rat Brain. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 97, n. 1, p. 140-148, 1 maio 2007.

BYRNE, M. L.; WHITTLE, S.; ALLEN, N. B. The Role of Brain Structure and Function in the Association between Inflammation and Depressive Symptoms: A Systematic Review. **Psychosomatic Medicine**, v. 78, p. 389-400, 2016.

CAMARGO, A. et al. Cholecalciferol abolishes depressive-like behavior and hippocampal glucocorticoid receptor impairment induced by chronic corticosterone administration in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S.L.], v. 196, p. 172971, set. 2020.

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

CAMPBELL, S. et al. Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering From Depression: a meta-analysis. **American Journal of Psychiatry**, [S.L.], v. 161, n. 4, p. 598-607, abr. 2004.

CANALE, A.; FURLAN, M. M. D. P. **Depressão**. Arq. Mudi, Maringá, v. 10, n. 2, p. 23-31, 2006.

CAROLA, V., et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v.134, n.1-2, p.49-57, 2002.

CASARIL, A. M. *et al.* Depression- and anxiogenic-like behaviors induced by lipopolysaccharide in mice are reversed by a selenium-containing indolyl compound: behavioral, neurochemical and computational insights involving the serotonergic system. **Journal of Psychiatric Research**, [S.L.], v. 115, p. 1-12, ago. 2019.

CASSEB, G. A. S. et al. Levels of 25-hydroxyvitamin D 3, biochemical parameters and symptoms of depression and anxiety in healthy individuals. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 2, p. 527–535, 2019

CASTREN, E; VOIKAR, V; RANTAMAKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Current Opinion in Pharmacology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 18-21, fev. 2007.

CHAO, C. C. et al. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. **Glia**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 276-284, mar. 1996.

CHATKIN, J. M. Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias. **J. Pneumol.**, v. 26, n. 1, p. 36–43, 2000.

CHEN, Hsiao-Jou Cortina *et al.* Response of the nitroergic system to activation of the neuroendocrine stress axis. **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 9, p. 01-07, 21 jan. 2015.

CHEN, Z.; SKOLNICK, P. Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 1365-1377, 22 ago. 2007.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 379-400, 23 jan. 2011.

CHRISTIANSEN, D. et al. Differential Effect of Inhibiting MD-2 and CD14 on LPS-Versus Whole E. coli Bacteria-Induced Cytokine Responses in Human Blood. **Advances In Experimental Medicine and Biology**, [S.L.], p. 237-251, 23 set. 2011.

CICHY, A. et al. Zinc-induced adaptive changes in NMDA/glutamatergic and serotonergic receptors. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 1184-1191, nov. 2009.

CIESLIK, K. et al. Chronic unpredictable stress-induced reduction in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is antagonized by zinc treatment. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 537-543, mar. 2011.

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

COLLA, A. R. S. et al. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 758, p. 171-176, jul. 2015.

CORDEIRO, R. C. *et al.* Leptin Prevents Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behaviors in Mice: involvement of dopamine receptors. **Frontiers In Psychiatry**, [S.L.], v. 10, p. 01-10, 12 mar. 2019.

CORPS, K. N.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. **JAMA Neurology**, 2015.

CORTESE-KROTT, M. M. et al. Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells. **Redox Biology**, [S.L.], v. 2, p. 945-954, 2014.

CORYELL, W.; WINOKUR, G. Transtornos depressivos. In: **Manual MSD – Versão para profissionais de saúde**. 2019. Retrieved by <https://www.msdmanuals.com>

CRANE, G. Iproniazid (marsilid) phosphate, a therapeutic agent for mental disorders and debilitating diseases. **Report of the American Psychiatric Association**, v. 8, p. 142–152, 1957.

CRISTINO, L. M. F. *et al.* Animal Model of Neonatal Immune Challenge by Lipopolysaccharide: a study of sex influence in behavioral and immune/neurotrophic alterations in juvenile mice. **Neuroimmunomodulation**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 391-401, 2022.

CROIX, C. M. S. et al. Nitric oxide-induced modification of protein thiolate clusters as determined by spectral fluorescence resonance energy transfer in live endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 785-792, set. 2004.

CRUSIO, W. E. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 125, p. 127–132, 2021.

CUNHA, F.Q.; MONCADA, S.; LIEW, F.y.. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 182, n. 3, p. 1155-1159, fev. 1992.

CUNHA, M. P. et al. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. **Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 32, n. 8, p. 1913-1920, dez. 2008.

CUSTÓDIO, C. S. et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 713, n. 1–3, p. 31–38, 2013.

CUSTÓDIO, C. S. *et al.* Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 713, n. 1-3, p. 31-38, ago. 2013.

CZAPSKI, G. A.; GAJKOWSKA, B.; STROSZNAJDER, J. B. Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus. **Brain Research**, [S.L.], v. 1356, p. 85-94, out. 2010.

DAFRE, A.L. et al. Multiple cellular targets involved in the antidepressant-like effect of glutathione. **Chemico-Biological Interactions**, v.;328, p. 109195, 2020.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 46-56, jan. 2008.

DELAY, J.; LAINE, B.; BUISSON, J. F. [The action of isonicotinyl-hydrazide used in the treatment of depressive states]. **Ann Med Psychol** (Paris), v. 110, n. 2 5, p. 689-92, 1952.

DHIR, A. *et al.* Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 125-131, abr. 2011.

DOBOSZEWSKA, U.; et al. Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex. **Behavioral Brain Research**, v. 287, p. 323-30, 2015.

DOUMA, S. L. et al. Estrogen-related Mood Disorders. **Advances In Nursing Science**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 364-375, out. 2005.

DOWLATI, Y. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 67, n. 5, p. 446-457, mar. 2010.

DRINGEN, R. *et al.* Glutathione Pathways in the Brain. **Biological Chemistry**, [S.L.], v. 384, n. 4, p. 505-5016, 10 jan. 2003.

DU, X.; PANG, T. Y. Is Dysregulation of the HPA-Axis a Core Pathophysiology Mediating Co-Morbid Depression in Neurodegenerative Diseases? **Frontiers In Psychiatry**, [S.L.], v. 6, p. 32-39, 9 mar. 2015.

DULLA, Y. A. et al. Regulatory Mechanisms of Vitamin D3 on Production of Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines in Microglial BV-2 Cells. **Neurochemical Research**, [S.L.], v. 41, n. 11, p. 2848-2858, 11 jul. 2016.

DUMAN, R. S. A Molecular and Cellular Theory of Depression. **Archives of General Psychiatry**, [S.L.], v. 54, n. 7, p. 597, 1 jul. 1997.



DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 59, n. 12, p. 1116-1127, jun. 2006.

DURSUN, E.; GEZEN-AK, D.; YILMAZER, S. Vitamin D Uygulamasının Primer Hippokampal Nöronlardaki İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (İNOS) Anlatımı Üzerine Etkileri. **Nöro Psikiyatri Arşivi**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 163-168, 5 jun. 2014. ‘

DUVOISIN R.M., Zhang C. P., fankuch T.F., et al. (2005). Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8. **European Journal of Neuroscience**, 22:425–36.

EAST, S. J. E J. GARTHWAITE. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-argininenitric oxide pathway. **Neuroscience Letters**, v.123, n 1, p.17-19, 1991.

ELLMAN GL. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**. 1959; 82(1): 70- 77.

EPSTEIN, F. H.; MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal of Medicine**, 1993.

EPSTEIN, F. H.; PARRILLO, J. E. Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock. **New England Journal of Medicine**, [S.L.], v. 328, n. 20, p. 1471-1477, 20 maio 1993.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **British Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 135, n. 5, p. 1079-1095, mar. 2002.

EYLES, D.W.; LIU, P. Y.; JOSH, P.; CUI, X. Intracellular distribution of the vitamin D receptor in the brain: comparison with classic target tissues and redistribution with development. **Neuroscience**, [S.L.], v. 268, p. 1-9, maio 2014.

FERRARI, F.; VILLA, R. F. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 4847-4865, 2017.

FIELDS, C. T. *et al.* Effects of gut-derived endotoxin on anxiety-like and repetitive behaviors in male and female mice. **Biology of Sex Differences**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 02-14, 19 jan. 2018.

FINKEL M.S., LAGHRISSI-THODE F., POLLOCK B.G., RONG J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 32, p. 653-658, 1996.

FÖCKER, M., et al.; Effect of an vitamin D deficiency on depressive symptoms in child and adolescent psychiatric patients - a randomized controlled trial: Study protocol. **BMC Psychiatry**, 18(1). 2018

FRAGA, D. B. et al. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**, [S.L.], v. 100, p. 16-23, maio 2018.

FRAZER A. Norepinephrine involvement in antidepressant action. **J Clin Psychiatry**, v.1, p. 25-30, 2000.

FREDERICKSON, C.; KOH, J; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 449-462, 13 maio 2005.

FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **The New England Journal of Medicine**, v. 252, n. 25, p. 1006–1008, 1954.

FRENOIS, F. et al.. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 516-531, jun. 2007

FUCHS, P. *et al.* Cerebral Ischemia in Diabetics and Oxidative Stress. **Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants**, [S.L.], p. 15-23, 2014.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 280, p. 373–376, 1980.

GALECKI, P. et al. An inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with the risk of recurrent depressive disorder. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 486, n. 3, p. 184-187, dez. 2010.

GAMMOH, O. *et al.* Vitamins C and D Exhibit Similar Antidepressant Effects to Escitalopram Mediated by NOx and FKBP in a Stress-Induced Mice Model. **Nutrients**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 2692, 9 jun. 2023.

GARCION, E. et al. New clues about vitamin D functions in the nervous system. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 100-105, abr. 2002.

GARDNER, A.; BOLES, R. G. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. **Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 730-743, abr. 2011.

GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, v.27, n.11, p.2783-2802, 2008.

GARTHWAITE, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 4-5, p. 413-416. 1989.

GARTHWAITE, J. NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status *British Journal of Pharmacology*, 2019.

GARTHWAITE, J; BOULTON, C L. Nitric Oxide Signaling in the Central Nervous System. **Annual Review of Physiology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 683-706, out. 1995.

GAWALI, N. B. et al. Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress-induced anxiety, depression-like behaviours and cognitive impairment by modulating nitrenergic signalling pathway. **Brain Research**, 2017.

GAWEŁ, S., et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiadomości Lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)**. v. 57, n9-10), p.453-455, 01 Jan 2004

GAWRYLUK, J. W. *et al.* Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 14, n. 01, p. 123-130, 16 jul. 2010.

GHASEMI, M. et al. A. Mechanisms of action and clinical efficacy of NMDA receptor modulators in mood disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 80, p. 555-572, set. 2017.

GHASEMI, M. , FATEMI, A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 45, p. 168-182, 2014.

GHASEMI, M.; CLAUNCH, J.; NIU, K. Pathologic role of nitrenergic neurotransmission in mood disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 173, 54-87, 2019.

GILHOTRA, N. DHINGRA, D. Involvement of NO–cGMP pathway in anti-anxiety effect of aminoguanidine in stressed mice. **Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 33, n. 8, p. 1502-1507, nov. 2009.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, [S.L.], v. 140, n. 6, p. 918-934, mar. 2010.

GONÇALVES, B.; FAGULHA, T. Prevalência e diagnóstico da depressão em medicina geral e familiar. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 13-27, jan. 2004.

GUEDES, R. et al. A20 deficiency causes spontaneous neuroinflammation in mice. **Journal of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 122, 2014.

GUIX, F.X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 76, n. 2, p. 126-152, jun. 2005.

HAASE, H.; RINK, L. Multiple impacts of zinc on immune function. **Metallomics**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 1175, 2014.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: oxford university press, v.1, 2007. 851p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 54–63, 2013.

HARRISON, S. R. et al. Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis. **Calcified Tissue International**, v. 106, n. 1, p. 58–75, 2020.

HASHIMOTO, K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. **Brain Research Reviews**, [S.L.], v. 61, n. 2, p. 105-123, out. 2009.

HE, M. et al. Paricalcitol alleviates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by suppressing hypothalamic microglia activation and neuroinflammation. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 163, p. 1-8, maio 2019.

HE, Ming-Chao *et al.* Paricalcitol alleviates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by suppressing hypothalamic microglia activation and neuroinflammation. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 163, p. 1-8, maio 2019

HENRY, C. J. *et al.* Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **Journal of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 01-14, 13 maio 2008.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 2015.

HERNÁNDEZ-VADEL, M. (2021). Efficacy of vitamin D in the treatment of depression: a systematic review and meta-analysis. *Actas Esp Psiquiatr*, 49(1), 12–23.

HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A. [25] Nitric-oxide synthase assays. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 250-258, 1994.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1–21, 2015.

HOLTZHEIMER, P. E.; NEMEROFF, C. B. Advances in the treatment of depression. **Neurorx**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 42-56, jan. 2006.

HONGXIA, L. et al. Zinc inhibited LPS-induced inflammatory responses by upregulating A20 expression in microglia BV2 cells. **Journal of Affective Disorders**, [S.L.], v. 249, p. 136-142, abr. 2019.

IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1989.

JANGRA, A. *et al.* Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 740, p. 337-345, out. 2014.

JAROSZ, M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 11-24, 12 jan. 2017.

JIANG, W.; WU, D. B.; XIAO, G. B.; DING, B.; CHEN, E. Q. An epidemiology survey of vitamin D deficiency and its influencing factors. *Medicina Clínica (English Edition)*, v. 154, n. 1, p. 7-12, 2020.

JIANG, XI *et al.* Lipopolysaccharide-induced depression is associated with estrogen receptor- $\alpha$ /SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling pathway in old female mice. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 148, p. 105097, set. 2021.

JOSHI, N.; SINGH, S. Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology *Journal of Neuroscience Research*, 2018.

KALUEFF, A. V. *et al.* Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 2538-2544, out. 2007.

KALUEFF, A. V. *et al.* Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 151-158, ago. 2004.

KALUEFF, A. V. *et al.* The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **Journal Of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 143, n. 2, p. 169-177, abr. 2005.

KANDEL E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. (1995). *Essentials of Neural Science and Behavior*. USA, Prentice Hall International, Inc.

KARAKAS, E.; REGAN, M. C.; FURUKAWA, H. Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 40, n. 6, p. 328-337, jun. 2015.

KAVIANI, M. *et al.* Effects of vitamin D supplementation on depression and some involved neurotransmitters. **Journal of Affective Disorders**, [S.L.], v. 269, p. 28-35, maio 2020.

KAWAURA, A. *et al.* Antidepressant-Like Effect of 1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin D3 on Mice in the Forced Swimming Test. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 81-84, 2017.

KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Alcoholism and inflammation: neuroimmunology of behavioral and mood disorders. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 25, p. 13-20, jun. 2011.

KENIS, G.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 401-412, dez. 2002.

KERN, N. et al. Neurobiology of Depression and Novel Antidepressant Drug Targets. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 18, n. 36, p. 5791-5801, 13 out. 2012.

KINUGAWA, K. et al. Transcriptional Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. **Circulation Research**, [S.L.], v. 81, n. 6, p. 911-921, dez. 1997.

KIRSTEN, T. B. et al. Zinc, but not paracetamol, prevents depressive-like behavior and sickness behavior, and inhibits interferon-gamma and astrogliosis in rats. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 87, p. 489-497, jul. 2020.

KJÆRGAARD, M. et al. Effect of vitamin D supplement on depression scores in people with low levels of serum 25-hydroxyvitamin D: nested case-control study and randomised clinical trial. **British Journal of Psychiatry**, [S.L.], v. 201, n. 5, p. 360-368, nov. 2012.

KNOWLES, R G; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 298, n. 2, p. 249-258, 1 mar. 1994.

KODYDKOVÁ, J. et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. **Clinical Biochemistry**, [S.L.], v. 42, n. 13-14, p. 1368-1374, set. 2009.

KOPP, C. et al. Effects of day-length variations on emotional responses towards unfamiliarity in Swiss mice. **Behavioural Processes**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 151-157, nov. 1997.

KOUBA, B.R. et al. Molecular Basis Underlying the Therapeutic Potential of Vitamin D for the Treatment of Depression and Anxiety. **International Journal of Molecular Sciences**; v. 23, n. 13, p. 7077, 2022.

KRAUSE, D. L.; MÜLLER, N. Neuroinflammation, Microglia and Implications for Anti-Inflammatory Treatment in Alzheimer's Disease. **International Journal of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 2010, p. 1-9, 2010.

KRISHNAN, V; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, [S.L.], v. 455, n. 7215, p. 894-902, out. 2008.

KROCZKA, B. et al. Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. **Brain Research Bulletin**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 297-300, maio 2001.

KUHN, R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry*, v. 115, n. 5, p. 459-64, 1958.

LEAL, L. K. A. M. et al. Vitamin D (VD3) antioxidative and anti-inflammatory activities: peripheral and central effects. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 879, p. 173099, jul. 2020.

LEAL, R. B et al. Lead-Stimulated p38MAPK-Dependent Hsp27 Phosphorylation. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 178, n. 1, p. 44-51, jan. 2002.

LEISTEDT, S. J.; LINKOWSKI, P. Brain, networks, depression, and more. **European Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 55-62, jan. 2013.

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 764-785, fev. 2012.

LEONARD, N.; et al. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. **Journal Clinical Pathology**, v.51, n.10, p.750-753, 1998.

LI, Zhe *et al.* The Important Role of Zinc in Neurological Diseases. **Biomolecules**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 28, 23 dez. 2022.

LI, W. *et al.* Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 92, p. 10-24, fev. 2021.

LI, Z; et al. Ginsenoside Rk1 alleviates LPS-induced depression-like behavior in mice by promoting BDNF and suppressing the neuroinflammatory response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 530, n. 4, p. 658-664, out. 2020.

LIEBERKNECHT, V. *et al.* Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 320, p. 365-373, mar. 2017.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 13, p. 757–772, abr. 2018.

LIMA, L. A. R. et al. Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 249-250, 31 ago. 2018.

LIND, M. et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017.

LISTER R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** 92:180–185, 1987

LIU, B.; HONG, J. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S.L.], v. 304, n. 1, p. 1-7, 1 jan. 2003.

LIU, D. et al. Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated microglial cells. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 592-599, set. 2011.

LIU, W. et al. The Role of Neural Plasticity in Depression: from hippocampus to prefrontal cortex. **Neural Plasticity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-11, 2017.

LIU, Z. et al. Extract of sesame cake and sesamol alleviate chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and memory deficits. **Journal of Functional Foods**, 2018.

LOBATO, K. R. et al. Involvement of the adenosine A1 and A2A receptors in the antidepressant-like effect of zinc in the forced swimming test. **Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 994- 9, 2008.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic Neurotransmission : The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 1563–1586, 2009.

LOWENSTEIN, C. J., PADALCO, E. *et al.* INOS (NOS2) at a glance. **Journal Of Cell Science**, [S.L.], v. 117, n. 14, p. 2865-2867, 15 jun. 2004.

LUDKA, F. K et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the l-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **European Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 400-412, maio 2013.

LUPERCHIO, S. *et al.* No-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 513-519, jan. 1996.

LYONS, C.R.; ORLOFF, G.J.; CUNNINGHAM, J.M.. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 267, n. 9, p. 6370-6374, mar. 1992.

MACHADO, A. P. R. et al. Neuroinflamação Na Doença De Alzheimer. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, [S.L.], v. 6, n. 14, p. 30-38, 3 fev. 2020.

MACKINNON, R. Potassium channels. **Febs Letters**, [S.L.], v. 555, n. 1, p. 62-65, 7 out. 2003.

MADRIGAL, J. L. M. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex



after acute restraint stress is regulated by nuclear factor  $\kappa$ B-mediated mechanisms. **Journal of Neurochemistry**, [S.L.], v. 76, n. 2, p. 532-538, jan. 2001.

MAES, M. An intriguing and hitherto unexplained co-occurrence: depression and chronic fatigue syndrome are manifestations of shared inflammatory, oxidative and nitrosative (io&ns) pathways. **Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 784-794, abr. 2011.

MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 29, n. 3, p. 287–291, 2008.

MAES, M., et al.. Lower whole blood glutathione peroxidase (GPX) activity in depression, but not in myalgic encephalomyelitis / chronic fatigue syndrome: another pathway that may be associated with coronary artery disease and neuroprogression in depression. **Neuro Endocrinol Lett.** v.32, n.02, p. 133-140, 2011.

MALBERG, J. E. et al. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 20, n. 24, p. 9104-9110, 15 dez. 2000.

MANOSSO, L. M. et al. Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation. **Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 59, p. 59-67, jun. 2015.

MANOSSO, L. M. et al. Evidence for the involvement of heme oxygenase-1 in the antidepressant-like effect of zinc. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 69, n. 3, p. 497-503, jun. 2017.

MANOSSO, L. M. et al. Involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant-like effect of zinc in the chronic unpredictable stress model of depression. **Journal Of Neural Transmission**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 339-352, 8 jan. 2016.

MARSLAND, A. L. et al. Interleukin-6 Covaries Inversely with Hippocampal Grey Matter Volume in Middle-Aged Adults. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 64, n. 6, p. 484-490, set. 2008.

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. **Current Neuropharmacology**, p. 527-550, 2014.

MARTINS, C. C. et al. Increased oxidative stress and inflammatory markers contrasting with the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway in patients with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 89, p. 63–69, mar. 2021.

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

MAZZETTI, A. P.; FIORILE, M. C.; PRIMAVERA, A.; BELLO, M. L. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10-18, 2015.

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

MELLO, B. S. F., *et al.* Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 320, p. 133–142, 2018.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and Its Discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 65, n. 9, p. 732-741, maio 2009.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. Are anti-inflammatory therapies viable treatments for psychiatric disorders? Where the rubber meets the road **JAMA Psychiatry**, v. 72, p. 527-528, 2015.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 22-34, 29 dez. 2015.

MISZTAK, P. *et al.* Antidepressant-like Effects of Combined Fluoxetine and Zinc Treatment in Mice Exposed to Chronic Restraint Stress Are Related to Modulation of Histone Deacetylase. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 22, 21 dez. 2021.

MLYNIEC, K. *et al.* GPR39 Zn<sup>2+</sup>-sensing receptor: a new target in antidepressant development?. **Journal Of Affective Disorders**, [S.L.], v. 174, p. 89-100, mar. 2015.

MLYNIEC, K. *et al.* The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 79, p. 290-297, abr. 2014.

MLYNIEC, K. *et al.* The role of the GPR39 receptor in zinc deficient-animal model of depression. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 238, p. 30-35, fev. 2013

MLYNIEC, K.; GAWEL, M.; NOWAK, G. Study of antidepressant drugs in GPR39 (zinc receptor<sup>-/-</sup>) knockout mice, showing no effect of conventional antidepressants, but effectiveness of NMDA antagonists. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 287, p. 135-138, jul. 2015.

MONCADA S. Nitric oxide. **Journal of Hypertension**. v. 12, p. 35-39, 1994.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

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**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 331-340, mar. 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.

MORRIS, C. J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. **Inflammation Protocols**, [S.L.], p. 115-122, 2003.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. Artmed, 8ª edição, 2014.

MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. *Nat Rev Drug Discov*, v. 16, n. 7, p. 472-486, 2017.

MURROUGH, J.; LAPIDUS, K.; SOLEIMANI, L. Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, [S.L.], p. 1101, ago. 2013.

NAKATANI, S.; MORI, K.; SHOJU, T. et, al. Association of Zinc Deficiency with Development of CVD Events in Patients with CKD. **Nutrients**. v.13, n.5, p. 1680. May, 2021. DOI:

NETEA, M. G. et al. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 135-139, mar. 2002.

NGUYEN, T. T. T. et al. Association between lower intake of minerals and depressive symptoms among elderly japanese women but not men: findings from shika study. **Nutrients**, n. 11, v. 2, p. 389, fev. 2019.

NOWAK, G. et al. Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. **Polish Journal of Pharmacology**, v.55, n.6, p. 1143-1147, 2003.

NOWAK, G. et al. Zinc treatment induces cortical brain-derived neurotrophic factor gene expression. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 492, n. 1, p. 57-59, maio 2004.

O'BRIEN, S. M.; SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 397-403, ago. 2004.

O'CONNOR, J. C. *et al.* Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 511-522, 15 jan. 2008.

OLIVENZA, R. *et al.* Chronic Stress Induces the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Brain Cortex. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 785-791, 25 dez. 2000.

OLIVERA, G. C. *et a.* Nitric Oxide Protects against Infection-Induced Neuroinflammation by Preserving the Stability of the Blood-Brain Barrier. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 12, n. 2, 25 fev. 2016.

OTTE, C. *et al.* Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 01-21, 15 set. 2016.

OZCAN, M. E. *et al.* Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **International Clinical Psychopharmacology**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 89-95, mar. 2004.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524– 6., 1987.

PARK, S. K.; MURPHY, S. Nitric Oxide Synthase Type II mRNA Stability Is Translation- and Transcription-Dependent. **Journal of Neurochemistry**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 1766-1769, 23 nov. 1996.

PEREIRA, V. S.; HIROAKI-SATO, A. A brief history of antidepressant drug development: from tricyclics to beyond ketamine. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 30, n. 6, p. 307–322, 2018.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 83, n. 2, p. 346-356, dez. 1977.

PHILLIPS, C. Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: making the neuroplastic connection. **Neural Plasticity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-17, 2017.

POLAK, M. *et al.* Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations and Depressive Symptoms among Young Adult Men and Women. **Nutrients**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 4720-4730, 28 out. 2014.

PORTO, C. M.; SILVA, T. P. S.; SOUGEY, E. B. Contribuições da vitamina D no tratamento de sintomas depressivos e fatores de risco cardiovascular: protocolo de estudo para um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. **Trials**, v. 20, n. 1, p. 583, 2019.

PRASAD, A. S. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 646-652, nov. 2009.

PRUT, L. *et al.* The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 463, n. 1-3, p. 3-33, fev. 2003.

QUEVEDO, et al. **Depressão: Teoria e Clínica**. 2a ed ed. Porto Alegre: ArtMed, 2019.

REINER, A.; LEVITZ, J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron**, v. 98, n. 6, p. 1080–1098, 2018.

REMELLI, F. et al. Vitamin D Deficiency and Sarcopenia in Older Persons. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2861, 21 nov. 2019.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 13-19, fev. 2003.

ROSA, A. O. et al. Involvement of NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 144, n. 1-2, p. 87-93, set. 2003.

ROSA, J.M. et al. Antidepressant-like responses in the forced swimming test elicited by glutathione and redox modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 165-172, 2013.

RUHÉ, H. G; MASON, N. S; SCHENE, A. H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 331-359, 16 jan. 2007.

RYBKA, J. *et al.* Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.L.], v. 63, p. 187-194, out. 2013.

SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 737-755, maio 2000.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, 2012.

SANNA, A.; FIRINU, D.; ZAVATTARI, P.; et. al. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**. v. 10, n.1, p. 68. Janeiro de 2018.

SAYD, A. *et al.* Systemic Administration of Oleoylethanolamide Protects from Neuroinflammation and Anhedonia Induced by LPS in Rats. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 01-14, 28 dez. 2014.

SCHAAD, K. A. et al. The relationship between vitamin D status and depression in a tactical athlete population. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 40, 10 set. 2019.

SCHILDKRAUT, J. J. The Catecholamine Hypothesis of Affective Disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry**, [S.L.], v. 122, n. 5, p. 509-522, nov. 1965.

SENS, J. *et al.* Lipopolysaccharide administration induces sex-dependent behavioural and serotonergic neurochemical signatures in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S.L.], v. 153, p. 168-181, fev. 2017.

SENSI, S. L.; et al. The Neurophysiology and Pathology of Brain Zinc. **Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 31, n. 45, p. 16076-16085, 9 nov. 2011.

SHAHANI, N.; SAWA, A. Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [S.L.], v. 1820, n. 6, p. 736-742, jun. 2012.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

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.

SOLATI, Z. et al. Zinc monotherapy increases serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and decreases depressive symptoms in overweight or obese subjects: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Nutritional Neuroscience**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 162-168, 7 jan. 2015.

STAROWICZ, G. *et al.* Long-lasting antidepressant-like activity of the GPR39 zinc receptor agonist TC-G 1008. **Journal of Affective Disorders**, [S.L.], v. 245, p. 325-334, fev. 2019.

SOUSA, F. S. S. *et al.* Lipopolysaccharide-induced depressive-like, anxiogenic-like and hyperalgesic behavior is attenuated by acute administration of  $\alpha$ -(phenylselanyl) acetophenone in mice. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 146, p. 128-137, mar. 2019.

SOUZA, S. V. S. et al. Effects of cholecalciferol on behavior and production of reactive oxygen species in female mice subjected to corticosterone-induced model of depression. **Naunyn-Schmiedeberg'S Archives of Pharmacology**, [S.L.], v. 393, n. 1, p. 111-120, 28 ago. 2019.

SOWA-KUĆMA, M. et al. Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the hippocampus of suicide victims. **Journal of Affective Disorders**, [S.L.], v. 151, n. 3, p. 924-931, dez. 2013.

SPAHL, D. U. et al. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear zn<sup>2+</sup> release. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 100, n. 24, p. 13952-13957, 14 nov. 2003.

SPEDDING, S. Vitamin D and Depression: a systematic review and meta-analysis comparing studies with and without biological flaws. **Nutrients**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1501-1518, 11 abr. 2014.

STEIMER, T., & Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles inpsychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **Stress**, 6, 87–100.

STEIMLE, Alex; AUTENRIETH, Ingo B.; FRICK, Julia Stefanie. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. [S. l.]: Elsevier GmbH, 2016

STEINERT, J. R., T. CHERNOVA, et al. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **Neuroscientist**, v.16, n.4, p.435- 452, 2010.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, [S.L.], v. 85, n. 3, p. 367-370, mar. 1985.

STRIJBOS, P. J. L. M.; LEACH, M. J.; GARTHWAITE, J. Vicious Cycle Involving Na<sup>+</sup>Channels, Glutamate Release, and NMDA Receptors Mediates Delayed Neurodegeneration through Nitric Oxide Formation. **The Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 16, n. 16, p. 5004-5013, 15 ago. 1996.

STUEHR, D. J.; GRIFFITH, O. W. Mammalian Nitric Oxide Synthases. **Advances In Enzymology - And Related Areas of Molecular Biology**, [S.L.], p. 287-346, 22 nov. 1992.

SUN, X. et al. Melatonin produces a rapid onset and prolonged efficacy in reducing depressionlike behaviors in adult rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Neuroscience Letters**, 2017.

SWARDFAGER, W. et al. Potential roles of zinc in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 911-929, jun. 2013.

SZEWCZYK, B. S. et al. Interaction of zinc with antidepressants in the forced swimming test in mice. **Polish Journal of Pharmacology**, v.54, n.6, p. 681-685, 2002.

SZEWCZYK, B. S. et al. The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. **Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 323-329, mar. 2009.

TABRIZIAN, K. et a. Selective Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor Reversed Zinc Chloride-Induced Spatial Memory Impairment via Increasing Cholinergic Marker

Expression. **Biological Trace Element Research**, [S.L.], v. 173, n. 2, p. 443-451, 30 mar. 2016.

TAKEDA, A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. **Brain Research Reviews**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 137-148, dez. 2000.

TAKEDA, A.; TAMANO, H. Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. **Brain Research Reviews**, v. 62, n. 1, p. 33-44, 2009

TAO, W. *et al.* Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 308, p. 177-186, jul. 2016.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 9, p. 399-411, 2003.

THIBEAULT, I.; LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. **The Journal of Comparative Neurology**, [S.L.], v. 434, n. 4, p. 461-477, 2001.

THOMPSON, S. M. *et al.* An excitatory synapse hypothesis of depression. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 279-294, maio 2015.

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, p. 1179-1187, 2011.

TODOROVIĆ, N. *et al.* Prefrontal cortical glutathione-dependent defense and proinflammatory mediators in chronically isolated rats: modulation by fluoxetine or clozapine. **Neuroscience**, [S.L.], v. 355, p. 49-60, jul. 2017.

TOMASETTI, C. *et al.* Novel pathways in the treatment of major depression: focus on the glutamatergic system. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 4, p. 381-387, 2019.

TOMAZ, V.s. *et al.* Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, [S.L.], v. 268, p. 236-246, maio 2014.

TUIN, Annemarie *et al.* On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, [s. l.], v. 290, n. 2, 2006.

UINT, L. *et al.* Increased levels of plasma IL-1b and BDNF can predict resistant depression patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 65, p. 361-369, 2019.



UNDERHILL, S. M. et al. Neuronal excitatory amino acid transporter EAAT3: emerging functions in health and disease. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 123, p. 69-76, fev. 2019.

VOET, VOET & PRATT. **Bioquímica** – Artmed Editora, Porto Alegre. 2008. 15)

WANG, D.; AN, S. C.; ZHANG, X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 433, n. 1, p. 59-64, mar. 2008.

WATANABE, M.; et al. Susceptibility to stress in young rats after 2-week zinc deprivation. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 410-416, fev. 2010.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of cms. **Neuropsychobiology**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C.. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 2331-2371, dez. 2013.

WIMALAWANSA, S. J. Vitamin D Deficiency: effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation, and aging. **Biology**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 30, 11 maio 2019.

WOBKE, T. K.; SORG, B. L.; STEINHILBER, D. Vitamin D in inflammatory diseases. **Frontiers in Physiology**, [S.L.], v. 5, p. 1-20, 2 jul. 2014.

WORKER, N. A.; MIGICOVSKY, B. B.. Effect of Vitamin D on the Utilization of Zinc, Cadmium and Mercury in the Chick. **The Journal of Nutrition**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 222-224, 1 out. 1961.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders** - Global Health Estimates. 2017.

WRIGHT, B. M.; EILAND, E. H.; LORENZ, R. Augmentation with Atypical Antipsychotics for Depression: a review of evidence-based support from the medical literature. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 344-359, mar. 2013.

WU, C. et al. Association Between Serum Levels of Vitamin D and the Risk of Post-Stroke Anxiety. **Medicine**, [S.L.], v. 95, n. 18, p. 01-05, maio 2016.

XIE, Y. et al.. Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. **Journal of Biomedical Science**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 01-11, fev. 2012.

YAMAOKA, J. Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon- $\gamma$  or tumor necrosis factor- $\alpha$  in murine keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 27-35, maio 2000.

YANG, B. *et al.* Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 119, n. 8, p. 4881-4985, 11 abr. 2019.

YANG, B.; CHEN, Y.; SHI, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 8, p. 4881–4985, 24 abr. 2019.

YOSAEE, S. *et al.* Effects of zinc, vitamin D, and their co-supplementation on mood, serum cortisol, and brain-derived neurotrophic factor in patients with obesity and mild to moderate depressive symptoms: a phase ii, 12-wk, 2x2 factorial design, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Nutrition**, [S.L.], v. 71, p. 110601, mar. 2020.

YOUNG, J. J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, [S.L.], v. 169, p. 15-20, dez. 2014.

ZARATE, C. *et al.* New paradigms for treatment-resistant depression. **Annals of The New York Academy of Sciences**, [S.L.], v. 1292, n. 1, p. 21-31, jul. 2013.

ZEHNDER, D.; HEWISON, M. The renal function of 25-hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$ -hydroxylase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S.L.], v. 151, n. 1-2, p. 213-220, maio 1999.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Molecular mechanisms of NF- $\kappa$ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 453-457, 1 jun. 2000.

ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y.-P. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–17, 19 ago. 2019.

ZHENG, Z. H. *et al.* Neuroinflammation induces anxiety- and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 91, p. 505–518, 2021.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 799–817, 2014.

ZHU, W. *et al.* NLRP3 inflammasome activation contributes to long-term behavioral alterations in mice injected with lipopolysaccharide. **Neuroscience**, v. 343, p. 77–84, 2017

ZOFKOVÁ, I.; NEMCIKOVA, P; MATUCHA, P. Trace elements and bone health. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [S.L.], p. 1-7, 18 jan. 2013.

ZOMKOWSKI, A. D. *et al.* The role of the NMDA receptors and l-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in the forced swimming test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S.L.], v. 103, n. 2, p. 408-417, dez. 2012.

ZUNSZAIN, P. A.; HEPGUL, N.; PARIANTE, C. M. Inflammation and Depression. **Behavioral Neurobiology of Depression and its Treatment**, [S.L.], p. 135-151, 2013.