

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Potenciais efeitos de frutos de *Eugenia uniflora*
na prevenção de alterações neuroquímicas e
comportamentais em modelo animal de estresse
crônico imprevisível**

Natália Porto Flores

Pelotas, fevereiro de 2017.

Natália Porto Flores

Potenciais efeitos de frutos de *Eugenia uniflora* na prevenção de alterações neuroquímicas e comportamentais em modelo animal de estresse crônico imprevisível

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Francieli Moro Stefanello

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Gazal

Pelotas, fevereiro de 2017.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F635 Flores, Natalia Porto

Potenciais efeitos de frutos de *Eugenia uniflora* na prevenção de alterações neuroquímicas e comportamentais em modelo animal de estresse crônico imprevisível / Natalia Porto Flores ; Francielli Moro Stefanello, orientadora ; Marta Gazal, coorientadora. — Pelotas, 2015.

86 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Depressão. 2. *Eugenia uniflora*. 3. Estresse oxidativo. 4. Acetilcolinesterase. I. Stefanello, Francielli Moro, orient. II. Gazal, Marta, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Natália Porto Flores

Potenciais efeitos de frutos de *Eugenia uniflora* na prevenção de alterações neuroquímicas e comportamentais em modelo animal de estresse crônico imprevisível

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

23.02.2017

Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (orientadora) - Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela UFRGS



Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro - Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela UFRGS



Prof^a. Dr^a. Gabriele Cordenonzi Ghisleni - Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela UFSM

Dedico este trabalho a minha mãe e minha
irmã

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, o responsável por eu estar aqui, e, principalmente pela coragem de não ter desistido.

Posteriormente, a minha vó, que onde está sei que sempre esteve junto comigo.

A minha mãe e irmã, pelo amor, carinho, amizade, incentivo e sobre tudo pela paciência nesse e em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a todos que estiveram comigo neste momento, amigos, familiares e filhos.

Agradeço imensamente ao pessoal do biotério, os quais sempre foram muito solícitos.

Aos meus colegas de aula e de laboratório, e, em especial a Cris que compartilhou esse trabalho comigo e foi minha parceira nas férias.

Minha orientadora pela oportunidade, confiança, amizade e parceria.

Agradeço a UFPel, por tudo que me proporcionou, inclusive as dificuldades, as quais me proporcionou, pois certamente servirão de aprendizado para vida.

Finalmente, uma nota de agradecimento às instituições que apoiaram o projeto. Elas são a Universidade Federal de Pelotas, Universidade Católica de Pelotas, Universidade Federal de Santa Catarina, EMBRAPA, CAPES, CNPq e FAPERGS.

"Dias de luta, dias de glória"
(Charlie Brown)

PARTE I

RESUMO

FLORES, Natália Porto. **Potenciais efeitos de frutos de *Eugenia uniflora* na prevenção de alterações neuroquímicas e comportamentais em modelo animal de estresse crônico imprevisível.** 2017. 86 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

A depressão é um transtorno psiquiátrico relativamente comum, associado com significativa morbidade e mortalidade. Apesar do grande número de tratamentos farmacológicos, a taxa de sucesso dos antidepressivos não é maior que 50-60%. Desta forma, é de grande interesse a busca por novas terapias que possam auxiliar no tratamento desta doença. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração crônica de extrato de frutos de *Eugenia uniflora* (pitanga) em parâmetros comportamentais, de estresse oxidativo e na atividade da acetilcolinesterase em córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível (ECI). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com pitanga preveniu o efeito tipo depressivo induzido pelo ECI. Adicionalmente, o extrato de *E. uniflora* regulou a atividade da acetilcolinesterase, reduziu a lipoperoxidação e a produção de espécies reativas de oxigênio tanto em córtex pré-frontal quanto em hipocampo de animais submetidos ao ECI. Ainda, foi capaz de prevenir a redução na atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase em hipocampo. O conteúdo tiólico total foi reduzido pelo ECI somente nesta estrutura e o extrato não foi capaz de impedir esta alteração. Nenhuma modificação foi observada na atividade da enzima superóxido dismutase nas duas estruturas cerebrais testadas. Em conjunto, nossos achados sugerem um efeito neuroprotetor da pitanga por prevenir o comportamento tipo depressivo, dano oxidativo e aumento da atividade da acetilcolinesterase induzidos pelo ECI. E ainda, nossos dados fornecem mais evidências da importância da acetilcolinesterase e estresse oxidativo na fisiopatologia da depressão.

Palavras-chave: depressão; estresse oxidativo; acetilcolinesterase; *Eugenia uniflora*

ABSTRACT

FLORES, Natália Porto. **Potential effects of *Eugenia uniflora* fruits on the prevention of neurochemical and behavioral alterations in animal model of chronic unpredictable stress.** 2017. 86 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Depression is one of the most common psychiatric disorders, and depression is a relatively common psychiatric disorder associated with significant morbidity and mortality. Despite the large number of pharmacological treatments, the success rate of antidepressants is not greater than 50-60%. So, the objective of this work was to evaluate the effect of chronic administration of *Eugenia uniflora* fruit extract on behavioral parameters, oxidative stress markers and acetylcholinesterase activity in an animal model of depression induced by chronic unpredictable stress (CUS). Our results showed that *E. uniflora* treatment prevented the depressant-like effect induced by CUS. Additionally, the extract regulated the activity of acetylcholinesterase, reduced lipid peroxidation and reactive oxygen species in the prefrontal cortex and hippocampus from animals submitted to CUS protocol. This extract was able to prevent the reduction of antioxidant enzyme glutathione peroxidase in the hippocampus. Total thiol content was decreased by CUS only in this cerebral structure and fruit extract was not able to block this alteration. However, no change was observed in the superoxide dismutase activity in the prefrontal cortex and hippocampus. Taken together, our findings suggest a neuroprotective effect of *E. uniflora* by preventing the depressive-type behavior, oxidative damage and increased CUS-induced acetylcholinesterase activity. Furthermore, our data provide further evidence of the importance of acetylcholinesterase and oxidative stress in the pathophysiology of depression.

Key words: depression; oxidative stress; acetylcholinesterase, *Eugenia uniflora*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2)

FIGURA 2: Fontes intracelulares de espécies reativas

FIGURA 3: Síntese e degradação da acetilcolina

FIGURA 4: Folhas de pitanga

FIGURA 5: Flores de pitanga

FIGURA 6: Frutos de pitanga

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE - Acetilcolinesterase
ACh - Acetilcolina
ACTH - Adrenocorticotrofina
CAT - Catalase
CRH - Hormônio liberador de corticotrofina
DNA - Ácido dextrorribonucleico
ECI - Estresse crônico imprevisível
ER - Espécies reativas
ERN - Espécies reativas de nitrogênio
ERO - Espécies reativas de oxigênio
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GPx - Glutathione peroxidase
GR - Glutathione redutase
GSH - Glutathione
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
HP - Hipocampo
HPA - Hipotalâmico- pituitário-adrenal
IL - Interleucina
IL-1 β - Interleucina 1 β
IL-6 - Interleucina 6
IRS - Sistema de reposição inflamatória
MDA - Malondialdeído
(O₂^{•-}) - Ânion Superóxido
(OH[•]) - Radical Hidroxila
OMS - Organização mundial da saúde
RNA - Ácido Ribonucleico
SNC - Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β - Fator de crescimento transformado beta
TH - Transtornos de humor
TNF - Teste do nado forçado
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS	16
Objetivo Geral	16
Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
Depressão.....	17
Modelo Animal de Depressão	21
Estresse oxidativo e Depressão.....	24
Acetilcolinesterase e Depressão	29
<i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga).....	32
4. MANUSCRITO.....	36
5. CONCLUSÃO	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXO	86

PARTE II

1. INTRODUÇÃO

A depressão é uma doença crônica que afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017a). Geralmente ocorre no início da vida adulta, podendo seguir um curso crônico, afetando negativamente o prognóstico de outras doenças, tais como doença coronariana vascular, diabetes e osteoporose (CHARNEY & MANJI, 2004). Esta doença tem sido tratada farmacologicamente por três décadas, no entanto, com o passar do tempo não houve grandes avanços nas terapias disponíveis. Novos e mais toleráveis agentes antidepressivos foram introduzidos para seu tratamento, porém apenas um terço dos pacientes alcança um estado de remissão dos sintomas após um ensaio inicial de monoterapia com antidepressivos (EPSTEIN, 2014). Além da baixa taxa de remissão, muitos têm efeitos adversos, dificultando o tratamento (GAYNES et al., 2009; ROTHCHILD et al., 2009). Embora existam avanços no entendimento deste grave transtorno, a etiologia exata ainda permanece indefinida, o que dificulta o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes (KENDLER et al., 2011).

É conhecido que o desequilíbrio da sinalização redox está envolvido na fisiopatologia da depressão (MAES et al., 2011; MOYLAN et al., 2014), visto que o sistema nervoso é susceptível ao estresse oxidativo devido a suas características estruturais e metabólicas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem levar a danos em proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, contribuindo para a neurodegeneração (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; SIWEK et al., 2013).

Além disto, o sistema colinérgico é apontado como um dos sistemas de neurotransmissão envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos dos transtornos do humor (JANOWSKY et al., 1972). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor essencial, necessário para o bom funcionamento da transmissão colinérgica e regulação do processo de aprendizagem e memória, cuja ação é finalizada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (ANAND & SINGH, 2013; RINWA & KUMAR, 2014). Alguns relatos indicam que o estresse crônico pode causar alterações na AChE, o que sugere um possível envolvimento desta enzima com a depressão (NIJHOLT et al., 2004; RINWA & KUMAR 2013, 2014).

Considerando que a depressão é uma das doenças de maior prevalência e acarreta importantes prejuízos pessoais, sociais e econômicos, quando não tratada, é relevante o desenvolvimento de novas estratégias para auxiliar no tratamento deste grave transtorno. Neste sentido, estudos têm mostrado que os compostos antioxidantes têm atividade antidepressiva e, portanto, é razoável propor o uso de antioxidantes exógenos como auxiliar no tratamento da depressão (EREN et al., 2007; ZAFIR et al., 2009).

A *Eugenia uniflora*, popularmente conhecida como pitanga, é uma planta de frutos comestíveis muito utilizada na medicina popular (AMORIM et al., 2009). Pesquisadores relataram ação antifúngica, antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial das folhas de pitanga (ADEBAJO et al., 1989, SOUZA et al., 2004, VICTORIA et al., 2012). E ainda recentemente, VICTORIA e colaboradores (2013) demonstraram o papel hepatoprotetor e antidepressivo (VICTORIA et al., 2013a,b). Embora existam poucos estudos descrevendo as atividades biológicas dos frutos, BAGETTI e colaboradores (2011) demonstraram ação antioxidante dos extratos de frutas de pitanga, provavelmente devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi examinar o efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *E. uniflora* na prevenção de modificações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo estresse crônico imprevisível (ECI) em camundongos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos de extratos de frutos de *Eugenia uniflora* sobre parâmetros neuroquímicos e comportamentais em modelo animal de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível (ECI).

Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da administração do extrato hidroalcoólico de fruto de *Eugenia uniflora* sobre parâmetros comportamentais como os testes do campo aberto e do nado forçado em modelo animal de depressão induzida pelo ECI.

Determinar o efeito da administração de *Eugenia uniflora* sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo como as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), conteúdo total de grupamentos sulfidrilas e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos ao modelo de ECI.

Determinar o efeito da administração de *Eugenia uniflora* sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos ao modelo de ECI.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Depressão

A depressão é uma condição médica frequente, considerada um dos transtornos mais incapacitantes (ABRATA, 2014). Geralmente ocorre no início da vida adulta, podendo seguir um curso crônico, afetando negativamente o prognóstico de outras doenças, tais como doença coronariana vascular, diabetes e osteoporose (CHARNEY & MANJI, 2004). Dentre os sintomas pode-se destacar tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa ou baixa autoestima, distúrbios do sono ou do apetite, sensação de cansaço e falta de concentração. Além disto, sem um tratamento adequado pode prejudicar substancialmente a capacidade do indivíduo de desempenhar suas tarefas diárias. Na sua forma mais grave, a depressão pode levar ao suicídio (WHO, 2017b). Está associada a altos custos sociais e financeiros pela perda de produtividade, a alta frequência de faltas de trabalho e pela redução de eficiência profissional (KESSLER, 2012; COLLINS, 2013).

Neste transtorno pode haver um comprometimento dos sistemas cardiovascular, cerebrovascular, neuroendócrino, metabólico e imune (HEUSER, 2002; BAUER, 2008; WOLKOWITZ et al., 2010). Desta forma, indivíduos que sofrem de depressão possuem maior risco de desenvolver doenças, as quais são frequentemente associadas com o envelhecimento (SPECK & KUKULL, 1995; EVANS, 2005; WOLKOWITZ et al., 2010).

A fisiopatologia da depressão não está completamente entendida, no entanto, sabe-se que se trata de uma patologia multifatorial com influências ambientais, psicológicas e genéticas (MELLO, 2007). As considerações a respeito de sua etiologia estão passando de filosóficas para um paradigma mais científico (KENDLER et al., 2011; WILLNER, 2013). Atualmente é sabido que a depressão é uma doença complexa, a qual incorpora diferentes hipóteses, todas elas complexamente interligadas (LAGE, 2010). Hipóteses iniciais se concentravam nas monoaminas como serotonina, norepinefrina, e dopamina (HIRSCHFELD, 2000). Esta teoria surgiu com o aparecimento dos primeiros antidepressivos em meados do século passado, sendo que a descoberta de suas propriedades antidepressivas foi acidental. A imipramina foi inicialmente proposta para tratar pacientes com esquizofrenia e a iproniazida para tratar pacientes com tuberculose

(KUHN, 1999; LURIE, 1999). No entanto, observações clínicas mostraram que eram capazes de melhorar o humor destes pacientes. Estes fármacos favorecem o aumento da concentração das monoaminas na fenda sináptica. Em contraste, a reserpina utilizada para hipertensão reduz os níveis das monoaminas induzindo um quadro depressivo em humanos (SCHILDKRAUT, 1965). Resumindo, esta hipótese era relativamente simples, fármacos que diminuía os níveis de neurotransmissores induziam a depressão, e fármacos que aumentavam estes níveis atuavam como antidepressivos (AGUIAR et al., 2011). Desta forma, foi postulado que a depressão está associada com a disfunção monoaminérgica central. E, assim acreditava-se que a ação dos antidepressivos se baseava apenas no aumento das monoaminas no SNC (ELHWUEGI, 2004). No entanto, com os fármacos antidepressivos atualmente disponíveis, os quais reestabelecem os níveis de serotonina, menos de dois terços dos pacientes deprimidos conseguem remissão (MAES et al., 2009).

Entretanto, estudos têm sugerido um papel modulatório do sistema monoaminérgico na regulação do humor, e não como a via final. Neste sentido, outros sistemas estariam regulando a plasticidade sináptica e neuronal, tendo um papel crucial na neurobiologia e tratamento do transtorno depressivo (SANACORA et al., 2008; ZARATE & MANJI, 2008; MELLO, 2012).

O sistema neuroendócrino também é apontado como envolvido na fisiopatologia da depressão (AGUIAR, et al., 2011). Os principais neurotransmissores monoaminérgicos teriam envolvimento no funcionamento do sistema neuroendócrino, estando relacionado com o estresse, e a depressão seria uma resposta ao estresse crônico (AYALA, 2002; AGUIAR, et al., 2011). Sabe-se que o estresse crônico é um fator desencadeante de transtornos psiquiátricos como a depressão, levando a alterações neuroquímicas e neuroanatômicas que prejudicam o funcionamento normal do cérebro (NESTLER, 2002; BERTON & NESTLER, 2006). O hormônio liberador da corticotrofina (CRH) é o principal regulador da secreção de adrenocorticotrofina (ACTH) que, por sua vez, estimula o córtex da adrenal a produzir cortisol exercendo um papel importante na resposta fisiológica ao estresse (AYALA, 2002). Apesar disto, as teorias sobre disfunções serotoninérgicas e hipersecreção de cortisol não fornecem explicações suficientes para a natureza da depressão (MAES et al., 2009).

Outra hipótese aponta o envolvimento do sistema GABAérgico. O papel da disfunção GABAérgica neste transtorno foi inicialmente descrito por Emrich e

colaboradores (1980) (FERREIRA, 2004). Eles propuseram que o valproato era eficaz no tratamento da depressão, pois era capaz de compensar a deficiência de ácido- γ -aminobutírico (GABA) no encéfalo, elevando suas concentrações, corroborando com estudos clínicos que demonstraram níveis de GABA reduzidos no líquido de pacientes com depressão unipolar. Além disso, foi relatado que pacientes com depressão unipolar apresentam menores concentrações plasmáticas de GABA transaminase (enzima que catalisa a reação de formação do glutamato a partir do GABA) e menor atividade da GABA descarboxilase (enzima que catalisa a formação do GABA a partir do glutamato) (BRAMBILLA et al., 2003).

Ainda, o sistema colinérgico é apontado como um dos sistemas de neurotransmissão envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos dos transtornos do humor (JANOWSKY et al., 1972). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor essencial, necessário para o bom funcionamento da transmissão colinérgica e regulação do processo de aprendizagem e memória, cuja ação é finalizada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (ANAND & SINGH, 2013; RINWA & KUMAR, 2014). Esta enzima tem sido bem documentada por induzir a cascata de morte celular apoptótica no cérebro maduro (GREENFIELD & VAUX, 2002). Adicionalmente, alguns relatos indicam que o estresse pode causar alterações na AChE, o que sugere um possível envolvimento desta enzima com a depressão, visto que estudos apontam a depressão como uma resposta ao estresse crônico (AYALA, 2002; NIJHOLT et al., 2004; AGUIAIR, et al., 2011; RINWA & KUMAR 2013, 2014).

Existe também uma relação entre sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) (ZUNSZAIN et al., 2011). Estudos têm sugerido que infecções e processos inflamatórios podem levar ao desenvolvimento de distúrbios emocionais (LEONARD & SONG, 1996; ANISMAN & MERALI, 1999; MELLO, 2012). As citocinas podem alterar funções do organismo, inclusive aquelas mediadas pelo SNC (MAES, 1999; LEONARD & SONG, 1999). Pesquisadores demonstraram a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes deprimidos e suicidas (SCHIEPERS et al., 2005, BERK et al., 1997; CONNOR & LEONARD, 1998; MAES, 1999; THOMAS et al., 2005 ; LINDQVIST, 2009).

As citocinas são responsáveis pela resposta da fase aguda na inflamação, ocasionando vários aspectos clínicos da depressão, como hiperatividade do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) e distúrbio no metabolismo da serotonina

(MAES, 1994). Neste contexto, caracterizou-se a depressão como uma resposta inflamatória, onde existe um aumento da produção de interleucinas (IL-1 β , IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MAES et al., 1990-1991, 1991b, 1993; MIKOVA et al., 2001; SCHIEPERS et al., 2005).

A teoria que envolve o sistema imune com o SNC foi denominada “Teoria de ativação do Sistema de Resposta Inflamatório (IRS)”, devido a muitos aspectos do sistema inflamatório estar correlacionado com a imunidade celular durante a depressão maior (SONG et al., 1998; VAN OESTE & MAES, 1999). Posteriormente, conclui-se que os processos inflamatórios não atuavam sozinhos, mas juntamente com o estresse oxidativo e nitrosativo no desenvolvimento da depressão (MAES, 2008). Esta teoria foi denominada de “Indução inflamatória por vias de estresse oxidativo e nitrosativo”. Posteriormente, passou a ser denominada “Resposta inflamatória e (neuro) degenerativa”, a qual reúne a indução inflamatória por múltiplas vias de estresse oxidativo e nitrosativo acompanhada por neurodegeneração e diminuição da neurogênese (GARDNER & BOLES, 2010; ZUNSZAIN, HEPGUL & PARIANTE, 2013; MAES et al, 2009; MAES, 2010). Considerando a depressão como pertencente ao espectro de distúrbios neurodegenerativos (MAES, 2010), este rótulo mais tarde foi se transformado em “Hipótese inflamatória e neuroprogressiva”, sendo o termo “neuroprogressão” mais apropriado para descrever o envolvimento dos processos apoptóticos, anti-neurogênicos e neurodegenerativos do que o “neurodegeneração” (BERCK et al., 2011; MAES et al, 2011). Existem evidências de que a neuroprogressão desempenha um papel na fisiopatologia da depressão (MAES et al., 2009c, 2011d; BERK et al., 2011). Campell e Macqueen (2006) relataram mudanças no tamanho de hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior e gânglios basais em pacientes com transtorno depressivo em longo prazo.

Ainda, é crescente o corpo de pesquisa que aponta o estresse oxidativo no desenvolvimento de diversas patologias psicológicas e mentais, inclusive nos episódios de humor como a depressão (ANDREAZZA et al., 2007; PALTA et al., 2014). Esta hipótese tem forte apelo uma vez que o cérebro é susceptível ao dano oxidativo devido as suas características metabólicas e estruturais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SIWEK et al., 2013). As espécies reativas (ER) em excesso estão associadas a lesões celulares como a peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, inativação enzimática, ativação excessiva de genes pró-inflamatórios

[TNF- α , interleucinas (IL), fator de crescimento transformado beta (TGF- β)] e danos ao DNA (SILVA; FERRARI, 2011). Além disto, há vários relatos mostrando que o estresse crônico pode aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas diversas áreas cerebrais envolvidas na regulação do humor (LUCCA et al., 2009).

Adicionalmente, uma relação significativa entre depressão e estresse oxidativo foi observada através de estudos de marcadores de dano oxidativo. Pesquisadores demonstraram níveis mais elevados destes marcadores em pacientes com depressão em relação aos controles (YANIK et al., 2004; MICHEL et al., 2007; CHUNG et al., 2013). Além disto, foi relatada deficiência de defesas antioxidantes no plasma de pacientes depressivos, como SOD, catalase (CAT) e GPx, além do aumento da lipoperoxidação (MAES et al., 2000; TRABER et al., 2008). Em contrapartida, o tratamento com antidepressivos tem a capacidade de normalizar os níveis de marcadores do estresse oxidativo (HERKEN et al., 2007).

Modelo Animal de Depressão

Os modelos animais são ferramentas de grande importância tanto na pesquisa básica, quanto na aplicada. Estes modelos permitem o estudo da biologia humana e das doenças, além do desenvolvimento de medicamentos e o impacto de um determinado tratamento, no intuito de melhorar e promover a saúde humana (GREEK, 2009).

É impossível recriar fielmente todos os aspectos de uma determinada doença, principalmente, transtornos psiquiátricos (VALVASSORI et al., 2013). As principais dificuldades dos modelos animais para o estudo destes transtornos são devido à falta de evidência conclusiva de que as alterações observadas no cérebro do animal sejam equivalentes às que ocorrem no cérebro humano (POLLAC et al., 2010; CASEY et al., 2011). No entanto, se o modelo experimental mimetizar um ou alguns dos sintomas associados à doença ou for sensível aos fármacos utilizados clinicamente torna-se uma ferramenta valiosa na análise da multiplicidade de causas, fatores genéticos, ambientais ou farmacológicos (KATO et al., 2007, POLLAC et al., 2010; VALVASSORI et al., 2013).

Os modelos animais têm sido usados em psiquiatria há muito tempo, tanto em pesquisas clínicas que visam melhor compreensão dos transtornos mentais

como em ensaios que buscam novas alternativas de tratamento psicofarmacológico (MCGONIGLE, 2014). Apesar de apresentarem limitações, modelos animais possibilitam o estudo da interação entre as múltiplas variáveis, visto que, os distúrbios mentais são doenças complexas e multifatoriais. Entre as principais limitações está o fato de nos restringirmos à observação de alterações comportamentais ou fisiológicas em virtude da característica subjetiva e introspectiva destes transtornos (LAFOLLETE & SHANKS, 1993; ANDREATINI, 2002). No entanto, estudos utilizando modelos animais são muito importantes na compreensão dos transtornos mentais, pois os mesmos são responsáveis, em grande parte, pelo desenvolvimento das hipóteses que relacionam as possíveis bases neurobiológicas destas doenças e, pelo que se sabe atualmente, sobre as ações dos psicofármacos (ANDREATINI, 2002; INSEL, 2007; VALVASSORI et al., 2013).

Além disto, com o passar dos anos, estes modelos foram sendo aperfeiçoados, buscando-se mimetizar quadros psicopatológicos complexos, tendo sido desenvolvidos modelos animais validados e amplamente utilizados para diferentes tipos de transtornos mentais, como depressão, ansiedade e esquizofrenia que, ao longo dos anos, ajudaram no melhor entendimento da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos e no desenvolvimento de novas opções terapêuticas psicofarmacológicas (JONES et al., 2011; VALVASSORI et al., 2013).

Nos anos 80, Willner propôs três conjuntos de critérios para avaliar a reprodutibilidade e confiabilidade do uso de modelos animais no estudo das desordens mentais: validade aparente (também denominada validade de face), validade de construto e validade preditiva (WILLNER, 1986; ELLENBROEK & COOLS, 1990). A validade aparente ou de face está relacionada ao quanto um modelo pode mimetizar os sintomas de uma determinada condição clínica, já a validade de construto está relacionada com a capacidade de reproduzir os aspectos fisiopatológicos de determinada doença. E, por último, a validade preditiva, que diz respeito à capacidade de resposta frente aos agentes terapêuticos para determinada condição em humanos (WILLNER, 1986; MCGONIGLE, 2014). Os modelos animais para transtornos psiquiátricos têm aceitáveis níveis de validade preditiva, ou seja, apresentam uma boa capacidade de demonstrar que terapêuticas aplicadas a animais podem se correlacionar com os efeitos observados em humanos (MCGONIGLE, 2014).

A maioria dos modelos animais experimentais de depressão envolve uma exposição aguda ou crônica a um estressor específico, a fim de provocar um ou mais sintomas do transtorno, sendo atualmente um dos mais populares e utilizados o teste do nado forçado (TNF), que se baseia na observação de que roedores colocados em um cilindro sem possibilidade de fuga, preenchido com água, adotam uma postura imóvel após tentativas iniciais de fuga (PORSOLT et al., 1977; CRYAN et al., 2002). Tal comportamento pode ser interpretado como uma forma de desamparo aprendido ou comportamento de desespero e o tempo gasto tentando escapar pode ser aumentado pelo uso de antidepressivos (MCGONIGLE, 2014).

É um dos testes mais difundidos e utilizados, tanto pela rapidez e fácil execução como pela reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. Apesar disto, existem limitações, pois o estado de desamparo aprendido não é sustentado e, além disto, responde agudamente ao uso de antidepressivos, ao contrário do que se observa em pacientes deprimidos, que geralmente melhoram após algumas semanas do uso da medicação (ABELARIA et al., 2013). Adicionalmente, faz-se necessário um teste de campo aberto para avaliar a locomoção, para que se descarte falsos positivos nos casos de medicações que aumentem a locomoção, prolongando assim o tempo de tentativa de fuga, assim como os falsos negativos, no caso de medicações sedativas que promovam um menor tempo de tentativa de fuga nos animais (CRYAN & MOMBÉREAU, 2004). No entanto, é capaz de identificar o efeito terapêutico de todos os antidepressivos utilizados na prática clínica atualmente (CRYAN & HOLMES, 2005).

Os modelos mais utilizados que atendem a tal requisito são os modelos que envolvem métodos que levem a mudanças duradouras no comportamento, as quais podem ser revertidas pelo uso crônico de antidepressivos, mas não pelo uso agudo deles (CRYAN & MOMBÉREAU, 2004; MCGONIGLE, 2014). Sendo o modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) um dos que melhor reproduz as principais causas da depressão em humanos, permitindo a avaliação de padrões bioquímicos e parâmetros comportamentais, e possíveis intervenções farmacológicas (WILLNER, 1992; MCGONIGLE, 2013).

Dados da literatura apontam que a manifestação dos transtornos depressivos sofre influência genética e ambiental, sendo que a exposição a eventos estressores ao longo da vida é postulada como o principal fator de risco na etiologia e progressão da depressão (HENN & VOLLMEYER, 2004). Desta

forma, o modelo de ECI parece o mais adequado para investigação experimental da depressão do que os modelos de estresse agudo (WILLNER, 1992; MCGONIGLE, 2014).

O ECI se baseia na exposição crônica de roedores a diferentes agentes estressores, tanto físicos quanto psicológicos de forma imprevisível, induzindo diversas alterações fisiológicas e comportamentais tais como anedonia, elevação de corticosterona, redução da neurogênese, diminuição do comportamento de busca, alterações sexuais, agressividade, dentre outras, podendo todas estas ser revertidas pelo uso crônico de antidepressivos, o que confere ao modelo alta validade preditiva e fenomenológica (WILLNER, et al., 1992, D'AQUILA, 1994, WILLNER, et al., 1997; MCGONIGLE, 2014).

Segundo DA SILVA et al. (2012) modelos animais, principalmente utilizando-se roedores, como camundongos e ratos, podem ser uma eficientes “ferramentas” para a determinação da etiologia neurológica destes transtornos. E, apesar das grandes diferenças comportamentais entre os modelos murinos e o ser humano há testes que possibilitam a interpretação confiável dos resultados e possibilitam traçar um paralelo comparativo entre os fenótipos comportamentais destes animais e o ser humano (DA SILVA et al., 2012).

Estresse oxidativo e Depressão

O estresse oxidativo foi descrito por Sies (1991) como um desequilíbrio no balanço entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes. Quando as espécies pró-oxidantes superam os níveis de antioxidantes podem ocorrer danos às biomoléculas (SIES; 1991).

A instalação do estresse oxidativo pode ser promovida em detrimento da velocidade de remoção de espécies reativas, sendo pela diminuição das defesas antioxidantes ou pela geração excessiva destas espécies, as quais podem ser de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN), enxofre e carbono, sendo as principais, as ERO. As ER podem ainda ser didaticamente divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; MARTELLI & NUNES, 2014).

Em função das ações prejudiciais causadas pelo estresse oxidativo que comprometem as diversas atividades celulares, radicais livres, de forma geral, têm

sido considerados vilões. Contudo, uma série de estudos tem revelado que a formação de radicais livres é fundamental para o funcionamento fisiológico e celular adequado, e metabolismo regulado (RAHAL et al., 2014).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Isto permite a transferência de elétrons entre moléculas vizinhas. Alguns exemplos são: $\text{OH}^\bullet$ (radical hidroxila), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido), NO (óxido nítrico). Os radicais livres podem agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Os compostos não radicalares, como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e HOCl (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sendo portanto menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas na sua redondeza (MARTELLI & NUNES, 2014).

As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos e podem ser geradas por fontes endógenas e exógenas. Endogenamente, a principal fonte é o processo de respiração celular que ocorre no interior da mitocôndria, onde o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Figura 1) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; ENGERS, BEHLING & FRIZZO, 2011). Durante este processo são formados intermediários reativos, como o $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^\bullet$ e o H_2O_2 (CADENAS & DAVIES, 2000; ENGERS, BEHLING & FRIZZO, 2011). As mitocôndrias, através de uma sequência de reações de oxidação e redução reduzem praticamente todo o O_2 (NELSON & COX, 2011; MEO et al., 2016). No entanto, cerca de 2% a 5% é desviado para outras vias metabólicas e reduzido de forma univalente, dando origem aos radicais livres (SCHNEIDER, 2004). Outras fontes importantes são os peroxissomos e retículo endoplasmático (Figura 2) (HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014).

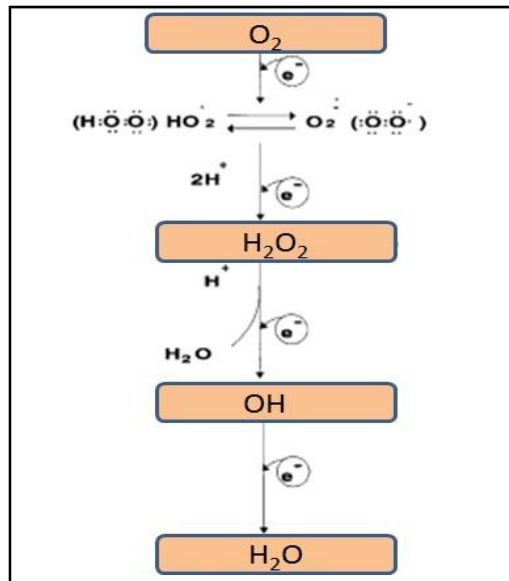


Figura 1: Redução tetraeletrônica do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria com aceitação de quatro elétrons formando água (H_2O) (Adaptado de FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

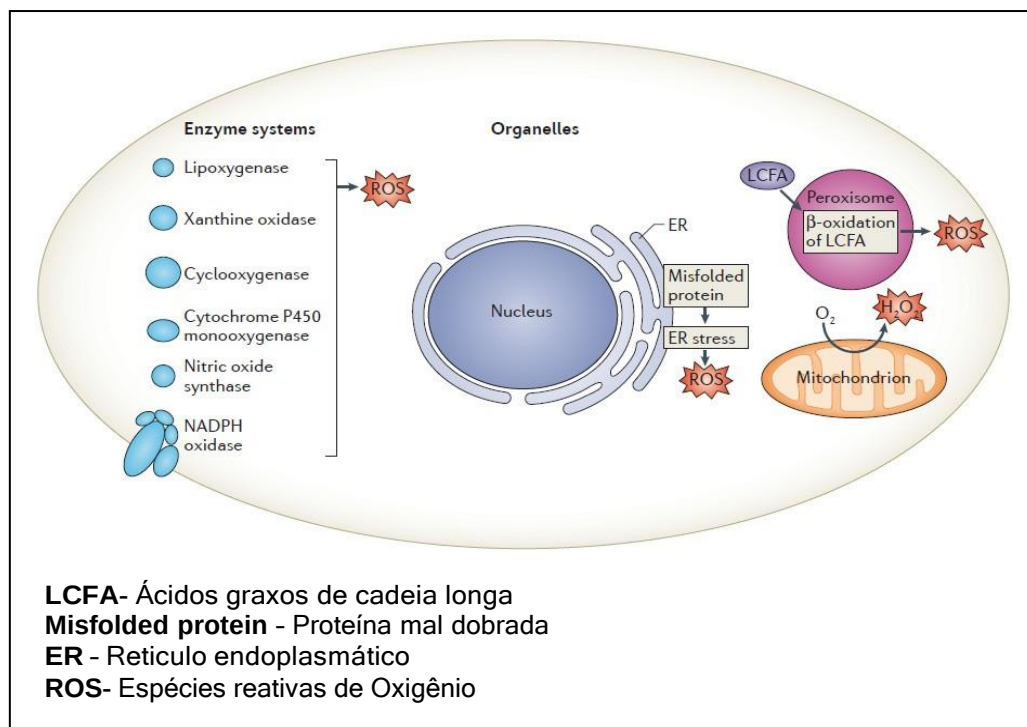


Figura 2: Fontes intracelulares de espécies reativas (adaptado de HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).

A formação de ER constitui um processo contínuo e fisiológico, desempenhando funções relevantes. Estas espécies atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas, na fagocitose,

sinalização celular, regulação de proteínas e resposta imunológica, no entanto, uma completa inibição de sua formação ou sua produção em excesso pode ser extremamente perigosa ao organismo, já que podem provocar reações em cadeia e oxidar moléculas como lipídeos, proteínas e DNA (VALKO et al., 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; RAHAL et al., 2014, MARTELLI & NUNES 2014). Adicionalmente, estão associadas a diversas patologias como disfunção hepática, inflamações, comprometimento imunológico, carcinogênese, podendo ainda causar dano ou morte celular (ZOU et al., 2010; ELLAH, 2011; BUTTERFIELD & SULTANA, 2011).

As membranas biológicas são vulneráveis aos ataques das ER, pois são compostas de lipídeos e proteínas. A peroxidação lipídica altera a arquitetura celular, o que interfere na sua permeabilidade e altera a seletividade nas trocas iônicas favorecendo a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos das células, podendo levar a ruptura e lise celular (TIMBRELL, 2000). Consequentemente ocorre a liberação e formação de produtos citotóxicos que são utilizados para monitorar o processo de lipoperoxidação em condições fisiológicas, sendo o malondialdeído (MDA) o principal produto, uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), comumente dosado. Ainda, os produtos da peroxidação lipídica podem reagir com macromoléculas como proteínas e bases nitrogenadas do DNA (MARNETT, 2002; NAIR et al., 2007).

A oxidação de proteínas decorre da ação das ER sobre os grupos tióis, causando também agregação e fragmentação de aminoácidos. Isto leva a mudanças estruturais e mau funcionamento catalítico podendo levar a inativação da proteína (SREEKUMAR, HINTON & KANNAN, 2011). Adicionalmente, as ER podem danificar proteínas transmembrana, como enzimas, receptores e canais iônicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Devido à produção contínua de ER nos processos metabólicos surgiram os mecanismos de defesa antioxidante. Deste modo, o organismo conta com um sistema de defesa endógeno enzimático, composto pelas enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx, e não enzimático a exemplo de glutathione reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido lipoico e coenzima Q. Além dos antioxidantes endógenos, o organismo utiliza antioxidantes exógenos provenientes da dieta como o alfa-tocoferol (vitamina E), betacaroteno, ácido ascórbico, e compostos fenólicos (BARREIROS et al., 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A GSH é o principal antioxidante endógeno, encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos (HUBER et., 2008). A maioria das células contém altas concentrações de GSH e uma quantidade muito menor de glutathiona oxidada. É importante para várias funções celulares, como por exemplo, a proteção do estresse oxidativo, mediação de reações enzimáticas, a regulação dos eventos metabólicos, o transporte de aminoácidos através das membranas celulares, a eliminação de compostos estranhos e a liberação de substâncias neurotransmissoras (BENOHR & WALLER, 1975; MORRIS et al., 2014). Alterações no metabolismo da GSH estão envolvidas na patogênese de algumas doenças que afetam o SNC (GU et al ., 2014; MORRIS et al., 2014). Neste contexto, dados recentes relatam que a diminuição de GSH e concomitante dano oxidativo e nitrosativo estão relacionados à fisiopatologia de doenças neuroimunes incluindo depressão, encefalomielite, doença de Parkinson, entre outras (MORRIS et al., 2014).

Pode-se definir estresse oxidativo quando a produção de ER causada por presença de toxinas ou ainda por ativação excessiva do metabolismo como em casos de inflamações crônicas – possui um balanço positivo em relação às defesas antioxidantes, ou ainda, quando estas defesas encontram-se com níveis diminuídos, por mutações enzimáticas ou ainda por deficiência de antioxidantes provenientes da dieta, apresentando o mesmo balanço negativo em relação às ER (ZOU et al., 2010, BUTTERFIELD & SULTANA, 2011, ELLAH, 2011).

Sabe-se que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas incluindo a depressão (CUMURCU et al., 2009; SIWEK et al., 2013). A vulnerabilidade do sistema nervoso é decorrente de suas características estruturais e metabólicas como alto consumo de oxigênio, grandes quantidades de cadeias lipídicas insaturadas, abundância de íons metálicos e baixa disponibilidade de enzimas antioxidantes (GU et al., 2008). É importante ressaltar que áreas cerebrais como o córtex cerebral, hipocampo e cerebelo são altamente vulneráveis aos danos causados pelas ERO (WANG et al., 2009).

Muitos estudos entendem que o desequilíbrio da sinalização redox é crucial na fisiopatologia e natureza neuroprogressiva da depressão (MAES et al., 2011). O estresse oxidativo e nitrosativo pode causar danos aos componentes celulares, induzir respostas autoimunes prejudiciais, e facilitar a falha dos processos normais da célula (MOYLAN et al., 2014). Neste contexto, dados da

literatura utilizando modelos animais e ensaios clínicos demonstraram associação da depressão com níveis elevados de produtos de reações redox (DIMOPULOS et al., 2008; FORLENZA & MILLER, 2006; GALECKI et al., 2009; YAGER et al., 2010). Além disto, outros estudos relataram dano oxidativo ao DNA (FORLENZA & MILLER, 2006; CHE et al., 2010). A desregulação de sistemas antioxidantes contribui para o desenvolvimento da depressão através da redução da proteção, resultando num risco aumentado de sofrer danos por ER (FORLENZA & MILLER, 2006, MAES et al., 2011, MOYLAN, 2014).

Considerando a vulnerabilidade do sistema nervoso ao ataque oxidativo e sua correlação com distúrbios neurológicos como a depressão, há crescente interesse no desenvolvimento de novas terapias antidepressivas baseadas em compostos antioxidantes (BERK et al., 2008; LEE et al. 2013).

Acetilcolinesterase e Depressão

A ACh é um mediador químico de sinapses no SNC, no sistema nervoso periférico e também na junção neuromuscular (BRUNEAU et al, 2006; VENTURA et al, 2009). É um neurotransmissor essencial para o bom funcionamento colinérgico e regulação do processo de aprendizagem e memória (VENTURA et al, 2009; RINWA & KUMAR, 2014). A ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (VENTURA et al, 2009).

ACh é uma amina sintetizada no citoplasma das terminações nervosas. A colina, obtida a partir da alimentação ou da própria degradação do neurotransmissor pela acetilcolinesterase (AChE), participará de uma reação de acetilação com Acetil-CoA, por ação da enzima colina acetiltransferase (Figura 3). As terminações nervosas, onde se processam estas sínteses, são ricas em mitocôndrias que disponibilizam o Acetil-CoA necessário para a reação. A ACh é degradada pela enzima AChE em colina e acetato, reduzindo sua quantidade na fenda sináptica e finalizando a transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas (RINWA & KUMAR, 2014; RANG, 2001). A colina liberada é reabsorvida pelo primeiro neurônio para ser reconvertida em ACh, permitindo assim a sua reutilização na transmissão de impulsos nervosos (Figura 3).

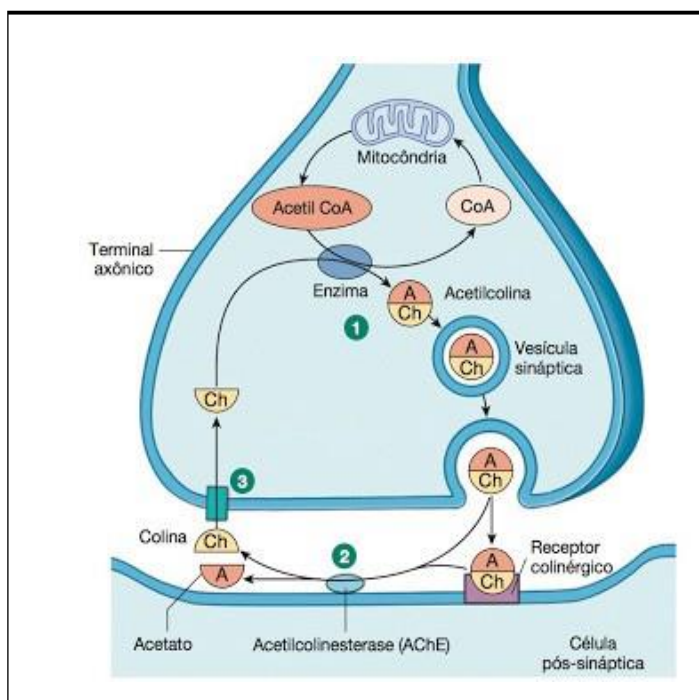


Figura 3: Síntese e degradação da acetilcolina (ARQUIVOBIOQ, 2017)

A AChE está presente no SNC e periférico (RANG, 2001). No periférico é responsável pela modulação dos impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e pela contração dos músculos lisos, enquanto que no central está envolvida com o controle motor, cognição e memória (RANG, 2001).

Estudos relatam uma disfunção do sistema colinérgico em síndromes neurológicas e psiquiátricas, como Alzheimer, esquizofrenia e transtornos do humor, inclusive depressão (JANOWSKY et al, 1972; VENTURA et al, 2009; WANG et al, 2015).

A depressão é frequentemente acompanhada por deficiências no funcionamento neurocognitivo que podem ser independentes do humor (AUSTIN et al., 2001; CLARK et al., 2009). Os sintomas cognitivos desta doença, tais como atenção e concentração pobres, bem como memória prejudicada e processamento de informação, apontam para déficits na função colinérgica (DEUTSCH, 1971).

A importância do sistema de neurotransmissão colinérgica tem sido significativamente evidenciada, visto sua relação com algumas doenças do SNC (VENTURA et al, 2009). Os fatores colinérgicos centrais podem desempenhar um papel nos transtornos afetivos. Um determinado estado afetivo pode representar um equilíbrio entre as atividades centrais neurotransmissoras colinérgicas e adrenérgicas nas áreas do cérebro que regulam o afeto (JANOWSKY, 1972). De

acordo com a hipótese colinérgica-adrenérgica proposta por Janowsky 1972, a depressão é caracterizada por um aumento da atividade colinérgica central em relação à adrenérgica (RONWTREE et al, 1950; JANOWSKY, 1972). O apoio a esta hipótese provém de experiências com animais que demonstraram efeitos comportamentais centrais de antagonistas colinérgicos e adrenérgicos. Além disto, a reserpina, um fármaco que causa depressão, tem propriedades colinomiméticas centrais e impede o armazenamento da serotonina e da noradrenalina nas vesículas sinápticas após sua recaptação; desta forma, estes neurotransmissores são degradados pela enzima monoamino oxidase (SCHILDKRAUT, 1965; JANOWSKY, 1972). Inversamente, os antidepressivos tricíclicos têm propriedades anticolinérgicas centrais, e ainda, inibem a ação desta enzima, aumentando as concentrações de serotonina e de noradrenalina, melhorando o humor depressivo de vários pacientes com este transtorno (JANOWSKY, 1972; KUHN, 1999; LURIE, 1999; MCARTHUR, 2006).

Além disto, parece que alguns antidepressivos clássicos têm como alvo parcial a neurotransmissão colinérgica. Por exemplo, o citalopram reverte o comprometimento da memória aumentando a liberação de ACh no hipocampo de animais de laboratório (EGASHIRA et al., 2006). O estabilizador de humor, lítio, também foi relatado por apresentar *up regulation* hipocampal dos receptores colinérgicos muscarínicos enfatizando o papel do sistema colinérgico na patologia da depressão (MARINHO et al., 1998).

O estresse agudo e o estresse crônico, quando imprevisível e incontrolável, podem aumentar a vulnerabilidade cerebral à neuropatologia (DE KLOET et al., 2005; DAGYTE et al., 2011). O estresse é conhecido por alterar o funcionamento do sistema colinérgico (GOLD, 2003; NIJHOLT et al., 2004; SRIKUMAR et al., 2006). O estresse agudo intensifica a geração de memórias vantajosas evolutivamente em relação a eventos potencialmente ameaçadores para o organismo (KIM & DIAMOND, 2002). O hipocampo é um componente crítico do circuito de estresse neuroanatômico, o qual também está envolvido na formação de memória episódica, espaciais e contextual (WILSON & MCNAUGHTON, 1993; MCEWEN, 1994, JENSEN & LISMAN 2000). O estresse induz alterações no funcionamento do hipocampo que requerem síntese de proteína e RNA, estando associados à expressão diferencial de genes precoces imediatos e envolvem splicing alternativo de numerosos transcritos, incluindo AChE (Cullinan et al., 1995; xu et al., 1998; Meshorer et al., 2002). Nijholt e colaboradores (2004)

demonstraram que o splicing alternativo provoca o acúmulo de AChE variante sendo utilizado pelo hipocampo para mediar efeitos de estresse sobre o condicionamento do medo e plasticidade neuronal. Assim, a disfunção de AChE variante deverá ser relevante para condições patológicas como o estresse pós-traumático e distúrbios do humor (NIJHOLT et al., 2004).

Foram relatadas alterações na ACh central em resposta ao estresse prolongado, sendo um fator de risco importante predisponente para desenvolver depressão (FINKELSTEIN et al., 1985; GILAD, 1987). Corroborando com estes achados, estudos com modelos animais de depressão (induzidos pelo estresse crônico) têm demonstrado um aumento significativo na atividade da AChE, sugerindo o envolvimento do sistema colinérgico com a depressão (RINWA & KUMAR, 2012; 2014). Além disto, Rada et al. (2006) demonstraram que os níveis de ACh seriam maiores nos animais submetidos à natação forçada quando os animais estavam com comportamento tipo depressivo e que esta alteração é compensada pela ativação da AChE (RADA et al., 2006).

***Eugenia uniflora* (Pitanga)**

O gênero *Eugenia* é considerado um dos maiores pertencentes à família Myrtaceae (subfamília Myrtaceae), com cerca de 500 espécies de árvores e arbustos na América tropical e subtropical. A maioria das espécies está distribuída no Brasil, assumindo uma importância na medicina popular devido as suas variadas propriedades terapêuticas (FAQUETI et al., 2013).

Uma destas espécies é a *Eugenia uniflora* comumente conhecida como pitanga. A pitangueira, nativa da região que se estende desde o Brasil Central até o norte da Argentina, distribuída por quase todo o território brasileiro, tem sido largamente disseminada por outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (FOUQUÉ, 1981; SANCHOTENE, 1985; WILLIAMS et al., 1987; BEZERRA et al., 2000; DONADIO et al., 2002). É uma espécie arbórea que, recentemente, tem sido explorada pelas indústrias alimentícias, cosméticas e medicinais (AMORIM et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011). Está sendo cultivada em muitos países, sendo adequada para a produção de sumo, polpas congeladas e chá (RATTMAN et al., 2012).

A pitangueira apresenta-se como um arbusto ou árvore semidecídua, de 4 a 10 m de altura, copa estreita, de tronco liso de cor pardo clara. As folhas são

simples, cartáceas, de 3 a 7 cm de comprimento, com aroma característico (Figura 3). As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas e nas extremidades dos ramos (Figura 4). Os frutos são do tipo drupa, globosos e sulcados, brilhantes e com colorações que variam de laranja-claro a roxo-escuro, apresentam polpa carnosa e agri-doce, contendo de 1 a 2 sementes (Figura 5) (LORENZI & MATOS, 2002).



Figura 4: Folhas de pitanga



Figura 5: Flores de pitanga



Figura 6: Frutos de pitanga

É uma planta de frutos comestíveis, muito conhecida e apreciada no Brasil.

Seus frutos maduros são bem característicos, arredondados e relativamente pequenos (ALMEIDA et al., 1995, AURICCHIO & BACCHI, 2003). A pitanga foi introduzida na medicina empírica pelos índios guaranis no século XV (FIUZA et al., 2008). É empregada na medicina popular para tratar inflamações, dores reumáticas, febre, também como hipoglicemiante, diurético (AMORIM et al., 2009).

As folhas de *E. uniflora* são muito utilizadas como diurético, antimicrobiano, antifúngico, hipotensor e hipoglicemiante (CONSOLINI et al., 1999, AURICCHIO &

BACCHI, 2003; VENDRUSCOLO et al., 2005; SOUZA et al., 2007, PEREIRA et al. 2009,). Muitos estudos experimentais têm demonstrado o potencial biológico dos extratos, óleos essenciais ou de frações obtidas de diferentes plantas desta família, como *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Eugenia punicifolia* (cereja do cerrado), *Eugenia singampattiana* (Kattukorandi), *Eugenia jambolana* Lam (jambolão) entre outras (PRADO et al., 2014, BASTING et al. , 2014, LOPES et al., 2014, JOHN et al., 2014, CHINNI et al., 2014).

Neste sentido, pesquisadores relataram a potencial ação antifúngica e antimicrobiana, hepatoprotetora e antidepressiva do óleo essencial das folhas de pitanga (ADEBAJO et al., 1989, SOUZA et al., 2004, VICTORIA et al., 2012, 2013). Já a atividade antioxidante foi relatada tanto em óleo essencial quanto extrato aquoso de folhas, e ainda, em extratos de frutos de *E. uniflora* (BAGETTI et al., 2011; VICTORIA et al., 2012; FIGUEIROA et al., 2013, VICTORIA et al., 2013 a, b). Colaborando com estes estudos, Bagetti e colaboradores (2011) demonstraram a capacidade antioxidante dos frutos e relacionaram com a presença de altos níveis de compostos fenólicos presentes na *E. uniflora*.

Os compostos fenólicos podem amenizar o estresse oxidativo agindo como eliminadores diretos de radicais livres e aumentando o nível de enzimas antioxidantes. Eles também atuam como quelantes de íons metálicos evitando a formação de radicais livres (SHAHIDI et al., 1992). Além disto, polifenóis podem combater a inflamação, bem como apresentar papel importante na excitotoxicidade, inibindo os receptores de glutamato e aumentando a recaptação de glutamato na sinapse, e ainda podem atuar no sistema colinérgico aumentando a disponibilidade de ACh através da regulação da atividade da AChE (DESAI, 2016). Anwar et al. (2012) relataram que os compostos fenólicos diminuíram a atividade da AChE no córtex cerebral e estriado de ratos Wistar adultos (ANWAR et al., 2012). Adicionalmente, antocianinas como a cianidina-3-glicosídeo encontrada no extrato de *Eugenia uniflora* desempenham importante papel de prevenção do dano oxidativo em diversas doenças (SIVASINPRASASN et al., 2016).

Deste modo, torna-se interessante investigar o papel do fruto de *E. uniflora* na prevenção de modificações comportamentais e bioquímicas induzidas em um modelo pré-clínico de depressão.

PARTE III

MANUSCRITO

Todos os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de manuscrito que será submetido ao periódico internacional *Brain Research Bulletin*

Neuroprotective effects of *Eugenia uniflora* fruit extract on behavioral and neurochemical changes induced by chronic unpredictable stress

Natália Porto Flores^a, Christine Berny Volz^a, Vitor Clasen Chaves^b, Carlus Augustu Tavares do Couto^c, Mayara Sandrielly Pereira Soares^c, Giovana Duzzo Gamaro^c, Flávio Henrique Reginatto^b, Roselia Maria Spanevello^c, Claiton Leoneti Lencina^a, Marta Gazal^{d*}, Francieli Moro Stefanello^{a*}

^aLaboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^bLaboratório de Farmacognosia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^cLaboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^dPrograma de Biologia Celular e Molecular – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Address reprint requests to: Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil. Phone: +55 53 32757355; E-mail: francieli.stefanelo@ufpel.edu.br and Marta Gazal, Programa de Biologia Celular e Molecular – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; E-mail: martagazal@hotmail.com

Abstract

Depression is one of the most common psychiatric disorders, and is a relatively common psychiatric disorder associated with significant morbidity and mortality. Despite the large number of pharmacological treatments, the success rate of antidepressants is not greater than 50-60%. So, the objective of this work was to evaluate the effect of chronic administration of *Eugenia uniflora* fruit extract on behavioral parameters, oxidative stress markers and acetylcholinesterase activity in an animal model of depression induced by chronic unpredictable stress (CUS). Male Swiss mice were exposed to a series of stressors for a period of 21 days. Vehicle, fluoxetine (20 mg/Kg) and hydroalcoholic extract (200 mg/Kg) were administered daily during CUS procedure. Our results showed that *E. uniflora* treatment prevented the depressant-like effect induced by CUS. Additionally, the extract regulated the activity of acetylcholinesterase, reduced lipid peroxidation and reactive oxygen species in the prefrontal cortex and hippocampus from animals submitted to CUS protocol. This extract was able to prevent the reduction of antioxidant enzyme glutathione peroxidase in the hippocampus. Total thiol content was decreased by CUS only in this cerebral structure and fruit extract was not able to block this alteration. However, no change was observed in the superoxide dismutase activity in the prefrontal cortex and hippocampus. Taken together, our findings suggest a neuroprotective effect of *E. uniflora* by preventing the depressive-type behavior, oxidative damage and increased CUS-induced acetylcholinesterase activity. Furthermore, our data provide further evidence of the importance of acetylcholinesterase and oxidative stress in the pathophysiology of depression.

Key words: Depression, Oxidative stress, Acetylcholinesterase, *Eugenia uniflora*

1. Introduction

Depression is a chronic disease that affects more than 300 million people worldwide (WHO, 2017). It is a frequent medical condition, considered one of the most disabling disorders (Charney and Manji, 2004). Chronic stress has been pointed out as a triggering factor for psychiatric disorders such as depression since it leads to neurochemical and neuroanatomical changes impairing the normal functioning of the brain (Nestler, 2002; Berton and Nestler, 2006). Besides that, there are several reports showing that chronic stress can increase the reactive oxygen species (ROS) generation in the several brain areas involved in the regulation of mood (Lucca et al., 2009; Siwek et al., 2013).

Although the exact etiology of depression remains undefined, it is known that it is complex disease with many factors involved such as dysregulation of neurotransmission and oxidative stress (Halliwell and Gutteridge, 2007; Siwek et al., 2013; Willner, 2013; Pytka et al., 2016). It is well known that brain is highly susceptible to oxidative damage due to its metabolic and structural characteristics, and still presents limited antioxidant capacity (Siwek et al., 2013). Exposure to chronic stress can cause oxidative stress and lead to change in the activity of acetylcholinesterase (AChE) (Lucca et al., 2009; Siwek et al., 2013; Rinwa and Kumar et al., 2013, 2014). Studies demonstrating that AChE respond to various insults including oxidative stress (Beckmann et al., 2014; Kumar and Singh, 2017).

Acute stress and chronic stress, when unpredictable and uncontrollable, may increase cerebral vulnerability to neuropathology (De Kloet et al., 2005; Dagyte et al., 2009). Stress is known to alter the functioning of the cholinergic system, being one of the neurotransmission systems involved in the pathophysiological mechanisms of mood disorders such as depression (Srikumar et al., 2003; Gold et al., 2003 Nijholt et al., 2004; Dagyte et al., 2011).

New and more tolerable antidepressant agents have been introduced in the therapy of depression, however clinical reality showed that only a third of patients achieve a state of symptom remission following an initial trial of antidepressant monotherapy (Blair and Briley, 2011; Epstein, 2014). Besides the low rate of remission many drugs have present side effects making treatment difficult (Gaynes et al., 2009). Considering the impact of depression, new strategies are needed. Studies have shown that antioxidant compounds have antidepressant activity and, therefore, it is reasonable to propose its use

as an adjuvant in the treatment of depression (Eren et al., 2007, Zafir et al., 2009).

Eugenia uniflora, a Brazilian native species, has been reported to have high levels of phenolic compound and related to its antioxidant action (Bagetti et al., 2011). Phenolic compounds can ameliorate oxidative stress can combat inflammation, as well as play an important role in excitotoxicity, and may also act on the cholinergic system by regulation of AChE activity (Shahidi et al., 1992; Anwar et al., 2012; Desai, 2016). *E. uniflora* has been used in folk medicine in the form of leaf infusion and essential oil (Consolini et al., 1999). The antioxidant activity was demonstrated in oil and aqueous extract of leaves, and also in extracts of fruits (Bagetti et al., 2011; Victoria et al., 2012, 2013; Figueiroa et al., 2013). In addition, were reported effect antidepressant of essential oil leaves (Victoria, 2013). However, there are no studies reporting this action on fruits of *E.uniflora*. In addition, most studies focus on leaves because of their widespread use in folk medicine.

Thus, the aim of the present study was to examine the effect of the hydroalcoholic extract from *E. uniflora* fruit in behavioral and neurochemical modifications induced by chronic unpredictable stress (CUS) in mice.

2. Materials and methods

Phytochemicals

Extraction

E. uniflora fruits (red type) were harvested in an orchard belonging to *Embrapa Clima Temperado* (Brazilian Agricultural Research Corporation) Pelotas/RS, Brazil (31°40'47"S and 52°26'24"W). After picking, the fruits were immediately frozen at -20°C and protected from light. The extracts were prepared according to Bordignon et al., (2009) with minor modifications. Briefly, unprocessed frozen *E. uniflora* fruits (30 g) were sonicated for 30 min at 25°C in 90 mL 70:30 v/v ethanol-water (pH 1.0). The crude extracts were filtered; the ethanol removed under reduced pressure and then lyophilized. These procedures were performed in triplicate and sheltered from light.

Total phenolic, flavonoid and anthocyanin contents

The total phenolic content was determined according to Singleton et al., (1999) with minor modifications. Data are mean $\pm$ SD values expressed as milligrams of gallic acid per 1 g of dried extract. The total flavonoid content was determined according to Miliauskas et al., (2004) with minor modifications. Data are mean $\pm$ SD values expressed as milligrams of rutin per 1 g of dried extract. All analyses were performed in triplicate. Anthocyanins were quantified by the pH differential method (Lee et al., 2005). The anthocyanin concentration was based on cyanidin-3-glucoside in a molar extinction coefficient of 26,900 and molecular weight of 449.2 g/mol. Data are mean $\pm$ SD values expressed as milligrams of cyanidin-3-glucoside per 1 g of dried extract. All analyses were performed in triplicate.

Identification of anthocyanins by LC/PDA/MS/MS

Anthocyanins were identified using an Acquity-UPLCTM coupled to a photodiode array detector (PDA) and to a high-resolution mass spectrometer (Xevo[®] G2 QT of model – WATERS[®]). The chromatographic separation was performed using a C18 chromatography column (SynergiTM- Phenomenex[®]) 4 μ m, 150 x 2.0 mm at 40°C, and the injection volume was 5 μ L. The elution was carried out using an aqueous solution of formic acid 2% (solvent A) and acetonitrile with 1% of formic acid (solvent B). The method used a linear gradient at constant flow (0.4 mL.min⁻¹). The total time of analysis was 34 min according to the following conditions: 0-10 min, 5-12% B; 10-29 min, 12-18% B; 29-33 min, 18% B; 33-34 min, 5% B. Detection was performed at 520 nm, and the range of spectral scanning in the visible region was 450 – 600 nm (PDA). Mass spectrometry detection was carried out with an electrospray ionization source (ESI) set on negative ion mode, capillary voltage, 1.0 kV, source block temperature, 120 °C, desolvation temperature, 600 °C; nebulizer nitrogen flow rate, 80 L h⁻¹, desolvation nitrogen gas flow, 800 L h⁻¹, and cone voltage, 40 V, controlled by MassLynx v.4.1 software for data acquisition and processing. The mass scanning ranged from m/z 200 to 1500 with a scan time of 0.5 s. MS/MS analysis was performed using a collision energy ramp (10 – 30 eV); and with argon as collision gas. All analyses were performed in triplicate.

Animals and drug treatments

Sixty male Swiss mice (8 weeks old, weighing 35–40 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained under controlled environment ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12h-light/dark cycle) and handled according to the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology guidelines upon approval by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, Brazil (4609-2015). All behavioral were carried out between 9:00 and 16:00 hours, with each animal used only once. The hydroalcoholic extract of *E. uniflora* and fluoxetine were dissolved in water and administered orally (p.o.) once a day during 21 days of treatment. Appropriated vehicle groups were also assessed simultaneously. The doses of extract (200 mg/Kg) and fluoxetine (20 mg/Kg) used in the present study were chosen according to the literature (Oliveira et al., 2017; Liang et al., 2012).

Chronic unpredictable stress (CUS)

A different group of animals was subject to CUS protocol. Animals were divided in 6 groups: control/vehicle, control/fluoxetine (20 mg/Kg), control/extract (200 mg/Kg), CUS/vehicle, CUS/fluoxetine (20 mg/Kg) and CUS/extract (200 mg/Kg). The CUS protocol was adapted from the procedure described by Liang et al., 2012 and consisted in a variety of stressors applied randomly and at different times of day during 21 days (Table 1). All control (i.e. non-stressed) and stressed animals were housed, but control mice were left undisturbed. Body weight was measured at the start of the stress period and then once a week until the end of protocol. In the CUS protocol, mice were submitted to the behavioural tests 24 hours after the last stressor. The animals were firstly evaluated in the open-field test and then immediately submitted to the FST.

Behavioral tests

Open-field test

Locomotor behavior was monitored using an open-field apparatus as described by Gazal et al., (2014). The apparatus consisted of a wooden box measuring 40×60×50 cm with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares and placed in a sound-free room. Animals were

placed in the rear left square and left to freely explore the apparatus. The number of squares crossed with all paws (crossing) was counted in a 5 minute section. The apparatus was cleaned up with an alcohol solution and dried after each individual mouse section.

Forced swimming test (FST)

Mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 10 cm, height 25 cm), with 19 cm of water at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. The total amount of time that each animal remained immobile during a 5 minutes section was recorded as immobility time (Gazal et al., 2014). Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. A decrease in the duration of immobility is indicative of an antidepressant-like effect.

Biochemical assay

Mice were killed by decapitation immediately after the behavioral tests. The prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus (HP) were manually dissected and homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at $750 \times g$ for 10 min at 4°C . The pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the biochemical measurements. The protein content was quantified by the method of Lowry et al. (1951) or Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

Thiobarbituric acid reactive species formation (TBARS)

TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined according to the method described by Ohkawa et al., (1979). Briefly, tissue supernatant was mixed with 15% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm and reported as nmol TBARS/mg protein.

Total sulfhydryl content

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001). The method is based on the reduction of DTNB by thiols, which in turn, becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, homogenates were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were reported as nmol TNB per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD activity was measured by the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted at 480 nm. The specific activity of SOD was reported as units per mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx) assay

GPx activity was measured using commercially available diagnostic kits supplied by RANDOX (Brazil). The specific activity was reported as units per mg of protein.

Reactive oxygen species (ROS) quantification

The ROS formation was determined according to Ali et al. (1992), with some modifications. In this assay, the oxidation of dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular reactive species. DCF fluorescence intensity emission was recorded at 525 and 488 nm excitation 60 min after the addition of DCFH-DA to the medium. ROS levels were expressed as $\mu\text{mol/g}$ of tissue.

Acetylcholinesterase (AChE) activity

AChE activity was determined as previously described (Ellman et al., 1961) with some modifications. Firstly the reaction system was composed 10 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 100 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 15 μL of homogenate and incubated at 2 min at 27°C. After that 8 mM acetylthiocholine, were added in the reaction and the absorbance was read in a spectrophotometer at 412 nm for 2 min with interval of 30s at 27°C. All samples

were performed in duplicate and AChE activity was expressed as $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein.

Statistical analysis

All experimental results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis was performed by one-way and two-way ANOVA followed by Bonferroni test for post-hoc comparison when appropriate. A value of $P \leq 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

We initially realized the phytochemical characterization of *E. uniflora* fruit hydro alcoholic extract. Our data showed that the total phenolic content was 7.92 ± 0.23 mg/g of dried extract while the total flavonoid content, 5.50 ± 0.68 mg/g of dried extract was detected. Total monomeric anthocyanin content was 1.72 ± 0.05 mg/g of dried extract. Analysis by LC/PDA/MS/MS showed the presence of nine anthocyanins (Table 2) of which just delphinidin-*O*-glucoside (Einbond et al., 2004) and cyanidin-3-*O*-glucoside (Einbond et al., 2004; Soares et al., 2015) were previously described for *E. uniflora* fruits. Considering the intensity of the peaks, it was possible to describe cyanidin-3-*O*-glucoside as the major anthocyanin present in these fruits. Additionally, as far as we are aware, this is the first report of cyanidin-*O*-galactoside, petunidin-*O*-hexoside, pelargonidin-3-*O*-glucoside, pelargonidin-*O*-rutinoside, malvidin-3-*O*-glucoside, malvidin-*O*-pentoside, and malvidin-*O*-acetylhexoside in *E. uniflora* fruits.

After 21 days of CUS, we evaluated the effect of *E. uniflora* fruit extract on behavioral tasks in an animal model of depression. We observed a reduction in the gain of weight (data not shown) and an increase in the immobility time in the FST indicative of a depression-like state (Figure 1A). Besides, no significant modifications were observed in the number of crossings in an open-field task indicating the lack of altered locomotion (Figure 1B). Notably, fruit extract and fluoxetine treatment prevented the depressant-like effect of CUS in the FST (treatment: $[F(2,41)=44.19, P<0.001]$, stress: $[F(1,41)=4.44, P<0.05]$, interaction: $[F(2,41)=32.16, P<0.001]$). On the other hand, the reduction in weight gain was not prevented by extract or fluoxetine (treatment: $[F(2,113)=1.39, P>0.05]$, stress: $[F(1,113)=16.55, P<0.001]$, interaction: $[F(2,113)=0.91, P>0.05]$). Neither control nor stress mice, treated with the

extract or vehicle, displayed any significant alteration in the locomotor activity in the open-field test, suggesting that the antidepressant-like effects of *E. uniflora* fruit extract are not related to modified locomotor activity (treatment: $[F(2,37)=2.50, P>0.05]$, stress: $[F(1,37)=1.38, P>0.05]$, interaction: $[F(2,37)=0.57, P>0.05]$).

In order to evaluate a neuroprotective effect of *E. uniflora* fruit extract against CUS-induced model of depression, we studied the effects of this extract and/or fluoxetine on oxidative stress parameters in brain regions. Figure 2 (A, C) shows that *E. uniflora* extract and fluoxetine treatments were able to prevent the increase in TBARS levels induced by CUS in the prefrontal cortex (treatment: $[F(2,20)=13.45, P<0.001]$, stress: $[F(1,20)=6.28, P<0.05]$, interaction: $[F(2,20)=9.28, P<0.01]$) and hippocampus (treatment: $[F(2,23)=33.78, P<0.001]$, stress: $[F(1,23)=13.44, P<0.01]$, interaction: $[F(2,23)=27.85, P<0.001]$). Besides, the enhance in ROS production (Figure 2B, D) was also prevented by extract and fluoxetine in the prefrontal cortex (treatment: $[F(2,18)=5.52, P<0.05]$, stress: $[F(1,18)=111.70, P<0.001]$, interaction: $[F(2,18)=15.30, P<0.001]$) and hippocampus (treatment: $[F(2,18)=7.09, P<0.01]$, stress: $[F(1,18)=24.66, P<0.001]$, interaction: $[F(2,18)=19.57, P<0.001]$).

Additionally, Table 3 shows that neither CUS nor *E. uniflora*/fluoxetine were able to modify SH content (treatment: $[F(2,20)=0.67, P>0.05]$, stress: $[F(1,20)=0.0, P>0.05]$, interaction: $[F(2,20)=0.29, P>0.05]$), SOD (treatment: $[F(2,19)=0.17, P>0.05]$, stress: $[F(1,19)=0.04, P>0.05]$, interaction: $[F(2,19)=3.05, P>0.05]$) and GPx activities (treatment: $[F(2,20)=0.37, P>0.05]$, stress: $[F(1,20)=0.13, P>0.05]$, interaction: $[F(2,20)=0.84, P>0.05]$) in the prefrontal cortex. However, in the hippocampus CUS protocol decreased SH groups (treatment: $[F(2,19)=2.50, P>0.05]$, stress: $[F(1,19)=10.09, P<0.01]$, interaction: $[F(2,19)=2.16, P>0.05]$) as well as GPx (treatment: $[F(2,19)=6.32, P<0.01]$, stress: $[F(1,19)=16.20, P<0.001]$, interaction: $[F(2,19)=4.39, P<0.05]$), but the extract and fluoxetine were able to prevent only the reduction in the enzyme activity. Additionally, SOD activity was not altered in these cerebral structures (treatment: $[F(2,20)=0.82, P>0.05]$, stress: $[F(1,20)=0.01, P>0.05]$, interaction: $[F(2,20)=0.17, P>0.05]$).

Finally, we studied the influence of chronic stress and treatment with *E. uniflora* and fluoxetine on AChE activity, since it is an important enzyme to neurotransmission. As can be seen in Figure 3, fruit extract and fluoxetine prevented the increase in this enzyme activity caused by CUS in the prefrontal cortex (treatment: [$F(2,19)=4.17$, $P<0.05$], stress: [$F(1,19)=1.51$, $P>0.05$], interaction: [$F(2,19)=22.10$, $P<0.001$]) and hippocampus (treatment: [$F(2,21)=7.65$, $P<0.01$], stress: [$F(1,21)=2.13$, $P>0.05$], interaction: [$F(2,21)=8.89$, $P<0.01$]).

4. Discussion

Depression is a major global public health problem (Ferrari et al., 2012). However, it has a low rate remission of symptoms and tolerance to available drugs (Nestler et al., 2002; Epstein, 2014). In view of this, it is necessary search and develop more effective and well-tolerated antidepressant compound. In the present study we demonstrated that chronic administration of *E. uniflora* fruit extract was able to prevent the depressive-like effect, oxidative damage and the increase of AChE activity induced by CUS in mice. However, this is the first report showing behavioral and neurochemical effects of extract *Eugenia uniflora* fruit in preclinical model of depression.

We used the chronic stress because it appears more suitable for the experimental investigation of depression than acute stress models (Willner, 1992). The CUS is one of the models that best reproduces the main causes of depression in humans, allowing the evaluation of biochemical and behavioral parameters in animals and possible pharmacological interventions (Willner, 1992; McGonigle, 2013).

The present study showed a reduction in body-weight gain in mice subjected to CUS associated with the depressive phenotype. The lower weight gain observed in stressed animals has been previously reported in models animal of stress (Lucca et al., 2009; Gazal et al., 2014). Interestingly, chronic *E. uniflora* treatment did not prevent the low weight gain in mice subject to CUS.

The FST is one of the most commonly behavior test used to detect and characterize the efficacy of antidepressant compounds and is sensitive to most of these drugs after acute administration (Moretti et al., 2012, McGonigle, 2013). In the present study, the animals submitted to the CUS increased the time of immobility in FST that was prevented by the chronic treatment with *E.*

uniflora extract, showing an antidepressant-like effect similar to fluoxetine in this task, without change the locomotor activity evaluated in the open-field test. Corroborating with our findings, Victoria et al. (2013) demonstrated the antidepressant-like effect of essential oils extracted from *E. uniflora* leaves, as well as the involvement of serotonergic and adrenergic systems in this effect.

Oxidative stress is an important factor involved in the pathophysiology of major neuropsychiatric disorders, including major depression (Siwek et al., 2013). A number of findings suggest that ROS can accumulate excessively in the brain and can severely attenuate the neuronal function (Massaad and Klann, 2011). Increase in ROS levels generates deleterious effects inducing lipid peroxidation in membranes, damage to proteins and nucleic acids (Mahadik et al., 2001). Our study showed that CUS increased ROS levels and lipid peroxidation by increasing the amount of TBARS in the prefrontal cortex and hippocampus of mice. In accordance with our data, studies from the literature showed that chronic stress induces increase reactive species generation leading to oxidative damage in several brain regions (Lucca et al., 2009; Moretti et al., 2012; Rinwa and Kumar, 2013; 2014; Gazal et al., 2014). In addition, we demonstrated that chronic treatment with *E. uniflora* presented a neuroprotective capacity similar to fluoxetine, inhibiting ROS generation and attenuating lipid peroxidation in the hippocampus and prefrontal cortex. These promising antioxidants results could be explained by accumulation of phenolic compounds and anthocyanins shown to *E. uniflora* fruit extract (Bagetti et al., 2011), which corroborates with our phytochemical characterization. Additionally, we identified nine anthocyanins and cyanidin-3-O-glucoside was the major compound present in these extract. Data from the literature demonstrated that this anthocyanin protect neurons from oxidative stress induced by glutamate and oxide nitric indicating neuroprotective mechanism (Winter, 2016).

Another relevant finding of our study was that, in the prefrontal cortex, CUS-induced oxidative damage was not accompanied by changes in the thiol content and activity of the antioxidant enzymes SOD and GPx. However, thiol group and GPx activity were reduced in the hippocampus and *E. uniflora* was able prevented this enzyme alteration. Previous studies from the literature demonstrated that SOD and GPx are lower in depressed patients (Maes et al., 2011).

Exposure to chronic stress can change activity of AChE - a crucial membrane-bound enzyme involved in cholinergic neurotransmission (Rinwa and Kumar et al., 2013, 2014). Besides, chronic stress can increase the ROS generation leading to oxidative stress, and AChE respond to various insults including oxidative damage (Lucca et al., 2009; Siwek et al., 2013; Beckmann et al., 2014; Kumar and Singh, 2017). Our findings demonstrated that chronic stress caused a significant increase in the AChE activity from prefrontal cortex and hippocampus. Corroborating Rinwa and Kumar (2013, 2014) reported an increase in AChE from hippocampus of animals submitted to chronic stress. Besides, Rada et al. (2006) demonstrated that ACh levels were higher in animals subjected to forced swim test and this increase alteration might be partially compensated by AChE activation. In contrast, chronic treatment with *E. uniflora* fruit extract it was able to prevent this change. In this way, Anwar et al. (2012) reported that phenolic compounds decreased AChE activity in the cerebral cortex and striatum of adult Wistar rats. So, the improved cholinergic activity in this study might also be attributed to phenolic compounds present in *E. uniflora*.

In conclusion, this study showed that *E. uniflora* extract, like fluoxetine, produced a significant antidepressant-like response and was able to prevent oxidative damage and cholinergic alterations induced by chronic stress in mice. It is important to high light that fruit extract administration produced similar neuroprotective effects to the well-established antidepressant fluoxetine, used as a positive control. Therefore, these findings may be of therapeutic relevance suggesting a potential role for *E. uniflora* fruit in the management of depressive disorders.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest in the study.

Acknowledgments

The Brazilian research funding agencies FAPERGS, CAPES and CNPq supported this study.

References

- Ali, S.F., LeBel, C.P., Bondy, S.C., 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 13,637-648.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's diseases. *Neuroscience Letters*. 302,141-145.
- Anwar, J., Spanevello, R.M., Thom, G., Stefanello, N., Schmatz, R., Gutierrez, J.M., Vieira, J.M., Baldissarelli, J., Carvalho, F.B., da Rosa, M.M., et al. 2012. Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 103,386-394.
- Bagetti, M., Facco, E.M.P., Piccolo, I. J. 2011. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 31,147 - 154.
- Beckmann, D.V., Carvalho, F.B., Mazzanti, C.M., Dos Santos, R.P., Andrades, A.O., Aiello, G., Rippilinger, A., Graça, D.L., Abdalla, F.H., Oliveira, L.S., Gutierrez, J.M., Schetinger, M.R., Mazzanti, A. 2014. Neuroprotective role of quercetin in locomotor activities and cholinergic neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sciences*. 103,79-87.
- Berton, O., Nestler, E.J. 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Review Neuroscience*. 137-151.
- Blier, P., Briley, M., 2011. The noradrenergic symptom cluster: clinical expression and neuropharmacology. *Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 7,15-20.
- Bordignon, J.R .C.L., Francescato, V., Nienow, A.A., Calvete, E., Reginatto, F.H., 2009. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciênc Tecnol Aliment*. 29,183-188.
- Bradford, M.A., 1976. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72,248-54.
- Charney, D.S., Manji, H.K., 2004. Life Stress, Genes, and Depression: Multiple Pathways Lead to Increased Risk and New Opportunities for Intervention. *Sci. STKE*. 225,1-11.
- Consolini, A.E., Baldini, O.A., Amat AG., 1999. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*. 66(1), 33-39.
- Dagyte, G., Van der Zee, E.A., Postema, F., Luiten, P.G., Den Boer, J.A., Trentani, A, et al. 2009. Chronic but not acute foot-shock stress leads to

temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience*. 162,904-913.

Dagyte, G., Den Boer, J.A., Trentani, A. 2011. The cholinergic system and depression. *Behavioural Brain Research*. 221, 574-582.

De Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 6,463-75.

Desa, I., 2016. Dietary Polyphenols as Potential Remedy for Dementia. *Adv. Neurobiol.* 12,41-56.

Einbond, L.S., Reynertson, K.A., Luo, X.D., Basile, M.J., Kennelly, E.J., 2004. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem*. 84, 23-28.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 7, 88-95.

Epstein, I., Szizindela, I., Katzmana, M.A., 2014. Pharmacological approaches to manage persistent symptoms of major depressive disorder: rationale and therapeutic strategies, *Psychiatric research*. 220, 15-33.

Eren, I., Naziroglu, M., Demirdas, A. 2007. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochemical Research*. 32, 1188 – 1195.

Ferrari, A., Somerville, A., Baxter, A., Norman, R., Patten, S., Vos, T., Whiteford, H. 2012. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. *Psychol Med*. 43, 471-481.

Figueiroa, E.O.; Da Silva, L.C.N.; De Melo, C.M.L. Lemoine Neves, J.K.A.; Da Silva, N.H.; Pereira, V.R.A.; Correia, M.T.D. 2013. Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of Fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content. *The Scientific World Journal*.

Gaynes, B.N., Warden, D., Trivedi, M.H., Wisniewski, S.R., Fava, M., Rush, A.J. 2009. What did STAR*D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. *Psychiatric Services*. 60,1439-1445.

Gazal, M., Kaufmann, F.N., Acosta, B.A., Oliveira, P.S., Valente, M.R., Ortmann, C.F., Sturbelle, R., Lencina, C.L., Stefanello, F.M., Kaster, M.P., Reginatto, F.H., Ghisleni, G. 2014. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. *Neurochem Res*. 40, 1421-30.

Gold, P.E., 2003. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem*. 80,194-210.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press.

Kumar, A., Singh, N., 2017. Inhibitor of Phosphodiesterase-4 improves memory deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neuropathological alterations in mouse models of dementia of Alzheimer's Type. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 88, 698-707.

Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int* 8,1269-1278.

Liang, S., Huang, R., Lin, X., Huang, J., Huang, Z., Liu, H., 2012. Effects of Yulangsang polysaccharide on monoamine neurotransmitters, adenylate cyclase activity and brain-derived neurotrophic factor expression in a mouse model of depression induced by unpredictable chronic mild stress. *Neural Regen Res*. 7, 191-196.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193,265-275.

Lucca, G., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E.C., Quevedo J., 2009. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International*. 54,358-362.

Maes, M., Galecki, P., Chang, Y.S., Berk, M., 2011. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 35, 676-692.

Mahadik, S.P., Evans, D., Lal, H., 2001. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 25,463-493.

Massaad, C.A., Klann, E., 2011. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid.Redox Signal*. 14,2013-2054.

McGonigle, P., 2013. Animal Models of CNS Disorders. *Biochemical Pharmacology*. 87(1),140-149.

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85,231-237.

Misra, H.P., Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247,3170-3175.

Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D.B., Budni, J., de Freitas, A.E., Farina, M., Severo Rodrigues, A.L., 2012. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal Psychiatry Research*. 46,331-340.

Nestler, E.J., Barrot, M., Dileone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron*. 13-25.

Nijholt, I., Farchi, N., Kye, M., Sklan, E.H., Shoham, S., Verbeure, B., Owe, D., Hochner, B., Spiess, J., Soreq, H., Blank, T., 2004. Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Molecular Psychiatry*. 9,174-183.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95,351-358.

Oliveira, P.S., Gazal, M., Flores, N.P., Zimmer, A.R., Chaves, V.C., Reginatto, F.H., Kaster, M.P., Tavares, R.G., Spanevello, R.M., Lencina, C.L., Stefanello, F.M. 2017. *Vaccinium virgatum* fruit extract as an important adjuvant in biochemical and behavioral alterations observed in animal model of metabolic syndrome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 88, 939-947.

Pytko, K., Podkowa, K., Rapacz, A., Podkowa, A., Żmudzka, E., Olczyk, A., Sapa, J., Filip, K.B., 2016. The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacol Rep*. 68,263-274.

Rada, P., Colasante, C., Skirzewski, M., Hernandez, L., Hoebel, B., 2006. Behavioral depression in the swim test causes a biphasic, longlasting change in accumbens acetylcholine release, with partial compensation by acetylcholinesterase and muscarinic-1 receptors. *Neuroscience*. 141, 67-76.

Rinwa, P., Kumar, A. 2013. Quercetin along with piperine prevents cognitive dysfunction, oxidative stress and neuro-inflammation associated with mouse model of chronic unpredictable stress. *Archives of Pharmacol Research*. 1-10.

Rinwa, P., Kumar, A. 2014., Modulation of nitergic signaling pathway by american ginseng attenuates chronic unpredictable stress induced cognitive impairment, neuroinflammation, and biochemical alterations. *Arch Pharmacol* 387,129-141.

Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.32, n.1, p.67-103.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods Enzymol*, (Parker L, ed.) Academic Press, Section III. 152-159.

Siwek, M., Sowa-kucma, M., Dudek, D., Styczen, K., Szewczyk, B., Kotarska, K., Misztak, P., Pilc, A., Wolak, M.G., Nowak, G. 2013. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep.* 65:1558-1571.

Soares, D.J., Pignitter, M., Ehrnhöfer-Ressler, M.M., Walker, J., Brasil, I.M., Somoza, V., 2015. Identification and quantification of oxidoselin-1,3,7(11)-trien-8-one and cyanidin-3-glucoside as one of the major volatile and non-volatile low-molecular-weight constituents in pitanga pulp. *Plos One* 10 (9).

Srikumar, B.N., Raju, T.R., Shankaranarayana Rao, B.S., 2006. The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats. *Neuroscience*. 143, 679-88.

Victoria, F.N., Lenardão, E.J., Savegnago, L., Perin, G., Jacob, R.G., Alves, D., Da Silva, W.P., Motta, A.D.S., Nascente, P.D.S., 2012. *Eugenia uniflora* L. Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 2668-2674.

Victoria, F.N., Brahm, A.D.S., Savegnago, L., Lenardão, E.J., 2013. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. *Neuroscience Letters*. 544, 105-109.

Willner, P., Muscat, R., Papp, M., 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience Biobehavior Review*. 525-34.

Willner, P., Schell-Kruger., Belzung, C. 2013. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 37, 2331-2371.

Winter, A.N., Ross, E.K., Khatter, S., Miller, K., Linseman, D.A., 2016. Chemical Basis for the Disparate Neuroprotective Effects of the Anthocyanins, Callistephin and Kuromanin, Against Nitrosative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 103, 23-24.

World Health Organization, Depression.

Disponível em : < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>> Acesso em: 20.01.17

Zafir, A., Banu, N., 2009. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J Biochem Biophys*. 46, 53-58.

Figure captions:

Figure 1: Effect of *E. uniflora* fruit extract (200 mg/Kg) and fluoxetine (20 mg/Kg) treatment on the forced swimming test (FST, A) and open-field test (B) in mice submitted to chronic unpredictable stress (CUS). Data was expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n =5-9 for group). (***) Denotes $P < 0.001$ as compared to the vehicle/control group. (###) Denotes $P < 0.001$ as compared to vehicle/CUS group.

Figure 2: Effect of *E. uniflora* fruit extract (200 mg/Kg) and fluoxetine (20 mg/Kg) treatment on TBARS levels (A, C) and ROS production (B, D) in the prefrontal cortex and hippocampus of mice submitted to chronic unpredictable stress (CUS). Data was expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 4-5 for group). (***) Denotes $P < 0.001$ as compared to the vehicle/control group. (**) Denotes $P < 0.01$ as compared to the vehicle/control group. (###) Denotes $P < 0.001$ as compared to vehicle/CUS group. (##) Denotes $P < 0.01$ as compared to vehicle/CUS group.

Figure 3: Effect of *E. uniflora* fruit extract (200 mg/Kg) and fluoxetine (20 mg/Kg) treatment on AChE activity in the prefrontal cortex (A) and hippocampus (B) of mice submitted to chronic unpredictable stress (CUS). Data was expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 4-5 for group). (***) Denotes $P < 0.001$ as compared to the vehicle/control group. (**) Denotes $P < 0.01$ as compared to the vehicle/control group. (###) Denotes $P < 0.001$ as compared to vehicle/CUS group. (##) Denotes $P < 0.01$ as compared to vehicle/CUS group.

Table 1. Schedule of stressor agents used in the 21-day of chronic stressful stimuli.

Day	Stressors	Duration
1	Retention	1.5h
2	Cold swim (15°C)	10 min
3	Wet wood shavings/box housing tilted (45°)	16h
4	Tail pinch	10min
5	Tail Suspension	6min
6	Deprivation of water and food	16h
7	Stimulating the smell (acetic acid)	16h
8	Retention	1.5h
9	Cold swim(15°C)	10 min
10	Watering shavings / tipping carton (45°)	16h
11	Tail pinch	10min
12	Deprivation of water and food	16h
13	Tail suspension	6 min
14	Retention	16h
15	Cold swim (15°C)	10min
16	Wet wood shavings/box housing tilted (45°)	16h
17	Tail pinch	10min
18	Tail suspension	6min
19	Deprivation of water and food	16h
20	Stimulating the smell (acetic acid)	16h
21	Retention	1.5h

Table 2. Chromatographic and spectroscopic profile of anthocyanins from fruits of *E. uniflora* (red type)

RT (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	Error (ppm)	MS/MS (m/z)	Identification ^a
6.50	523	465,1004	-6,2	303	Delphinidin-O-glucoside
7.24	515	449,1073	-2,4	287	Cyanidin-3-O-glucoside ^a
8.27	515	449,1065	-4,2	287	Cyanidin-O-galactoside
8.68	520	479,1166	-5,0	317	Petunidin-O-hexoside
10.07	505	433,1130	1,2	271	Pelargonidin-3-O-glucoside ^a
10.87	510	579,1751	6,4	271	Pelargonidin-O-rutinoside
11.58	523	493,1331	-3,0	331	Malvidin-3-O-glucoside ^a
13.84	523	463,1221	-4,1	331	Malvidin-O-pentoside
20.17	525	535,1471	3,6	331	Malvidin-O-acetylhexoside

^aIdentified by injection of corresponding authentic standards, literature data and mass spectra database (Reaxys®).

Table 3. Effect of *E. uniflora* fruit extract and fluoxetine treatment on oxidative stress parameters in the prefrontal cortex and hippocampus of mice submitted to chronic unpredictable stress (CUS).

	Total SH content	GPx activity	SOD activity
Prefrontal cortex			
Control/Vehicle	109.55±4.4	23.16±2.27	49.21±5.4
Control/Fluoxetine	97.24±7.2	24.21±5.16	53.17±1.12
Control/ <i>E. uniflora</i>	102.71±9.9	19.41±1.72	41.57±2.94
CUS/Vehicle	103.06±8.2	18.64±3.36	49.05±4.53
CUS/Fluoxetine	98.44±3.6	22.47±3.26	44.42±3.81
CUS/ <i>E. uniflora</i>	109.04±11.2	22.88±1.88	52.45±5.04
Hippocampus			
Control/Vehicle	130.58±7.73	30.99±1.10	52.68±5.55
Control/Fluoxetine	123.25±19.1	31.83±2.77	59.74±10.5
Control/ <i>E. uniflora</i>	154.75±16.8	32.13±1.58	49.88±5.21
CUS/Vehicle	97.17±13.9*	17.60±0.83**	48.77±9.48
CUS/Fluoxetine	118.02±8.3	27.79±3.50 [#]	57.74±1.44
CUS/ <i>E. uniflora</i>	114.24±9.15	29.63±1.39 ^{##}	53.84±7.16

Data was expressed as the mean ± S.E.M. (n = 4-5 for group). Total thiol content was reported as nmol TNB per mg protein and enzyme activities (SOD, GPx) as units/mg protein. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared to Control/Vehicle. [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 compared to CUS/Vehicle.

Figure 1

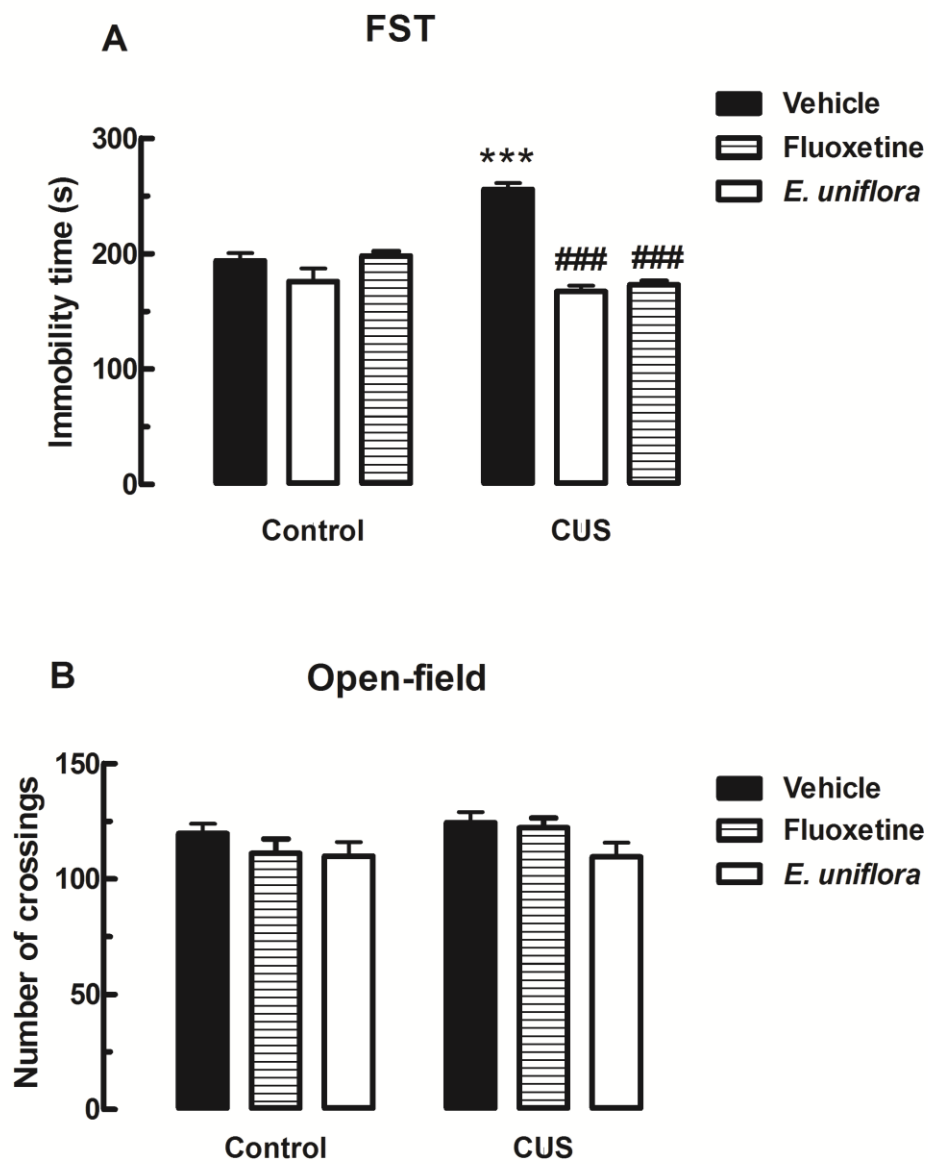


Figure 2

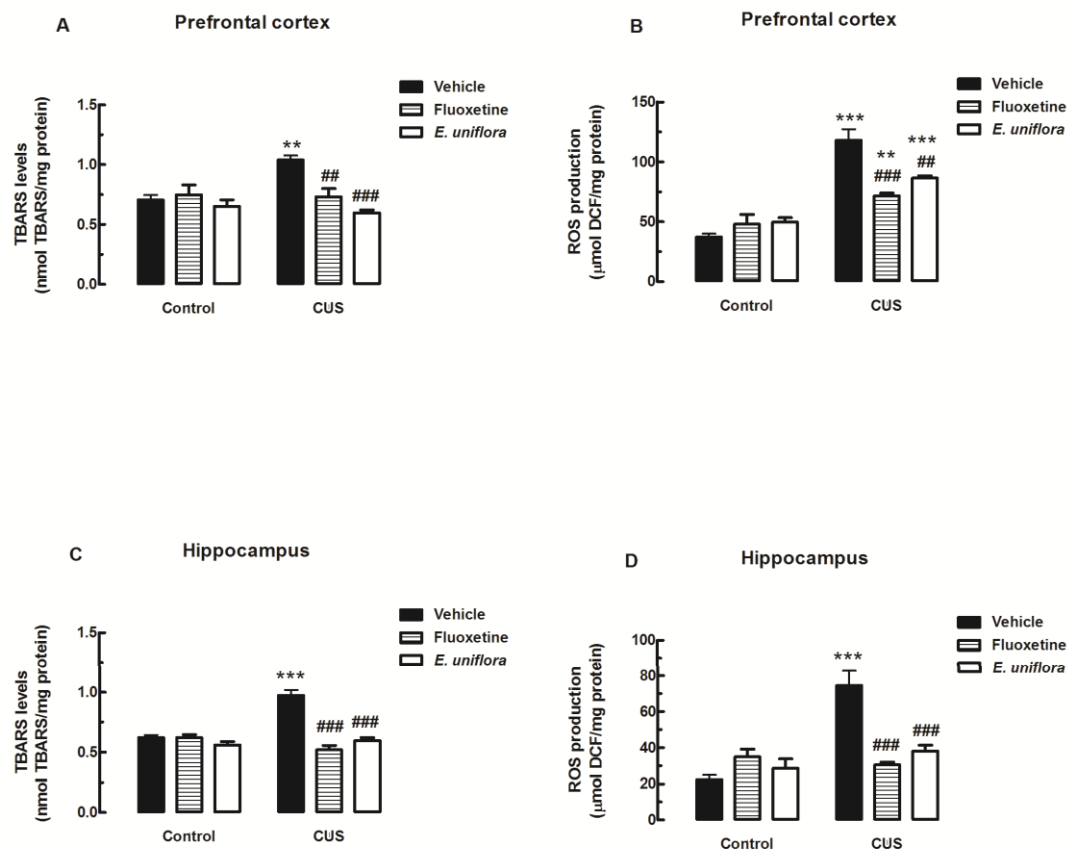
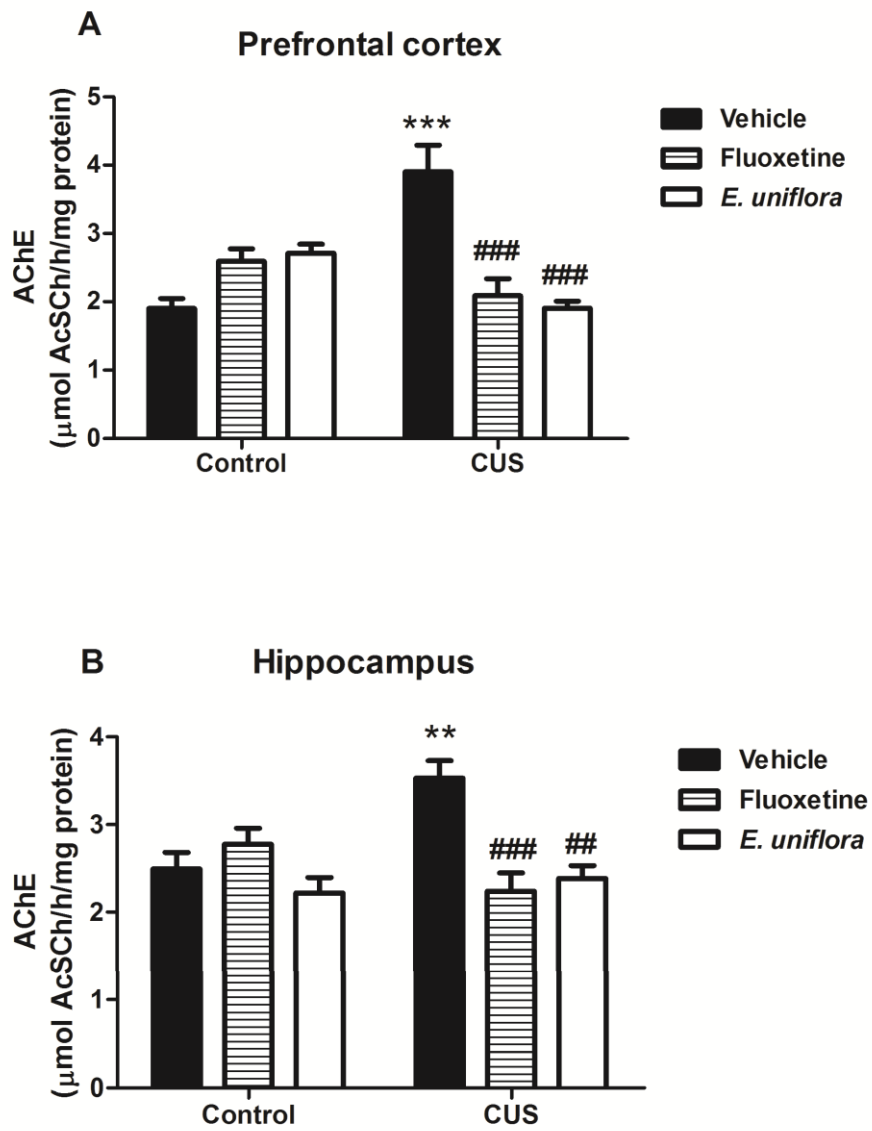


Figure 3



PARTE IV

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que o extrato de fruto de *Eugenia uniflora* foi capaz de prevenir alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo ECI. De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que o extrato foi capaz de reduzir a atividade da AChE, o dano oxidativo, e ainda, o aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sugerindo uma potencial ação antioxidante e antidepressiva. Os nossos achados apontam a *E. uniflora* como um promissor agente terapêutico auxiliar para pacientes com depressão. Dentro deste contexto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos benéficos deste fruto e maior compreensão da fisiopatologia da doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELARIA, H. M.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr*, Sipl. V.2, S112-S120, 2013.

ADEBAJO, A. C.; OLOKI, K.J.; ALADESANMI, A. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. *Journal Phytotherapy Resource*. v.3, p.258-259, 1989.

AGUIAR, C. C.; CASTRO, T. R.; CARVALHO, A. F.; VALE, O. C.; SOUSA, F. C.; VASCONCELOS, S. M. Drogas antidepressivas. *Acta Med. Port.*, v. 24, n. 1, p. 091-098, 2011.

ALMEIDA, E.C.; KARNIKOWSKI, M.G.O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista Saúde Pública*. v.29, p. 428-433, 1995.

AMORIM, A. C.; LIMA, C.K.; HOVELL, A.M.; , Miranda, A.L.; Rezende, C.M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*. v.16, n.10, p.923-928, 2009.

ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research* V.36, P.375-399, 2013.

ANDREATINI, R. A importância dos modelos animais em psiquiatria *Rev. Bras. Psiquiatr*. v.24, n.4, 2002.

ANDREAZZA, A.C.; FREY, B.N.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; ROMBALDI, F.; SANTIN, A.; GONCALVES, C.A.; KAPCZINSKI, F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res.*, v. 153, n. 1, p. 27-32, 2007.

ANISMAN, H.; MERALI, Z. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv. Exptl Med. Biol*. v.461, p.199-233, 1999.

ANWAR, J., SPANEVELLO, R.M., THOM, G., STEFANELLO, N., SCHMATZ, R., GUTIERRES, J.M., VIEIRA, J.M., BALDISSARELLI, J., CARVALHO, F.B., DA ROSA M.M., et al. Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* V.103, p.386-394, 2012.

ARQUIVOBIOQUI. Síntese e Degradação da acetilcolina. Disponível em: <http://arquivobioqui.blogspot.com.br/2015/11/sintese-e-reciclagem-da-acetilcolina-na.html> acessado em 20.03.17

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FAMILIARES, AMIGOS E PORTADORES DE TRANSTORNOS AFETIVOS – ABRATA. Disponível em:

<www.abrata.org.br/new/artigo/impactoDepressao.aspx> Acesso em: 25.5.14

AURICCHIO, M. T., BACCHI, E. Folha de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 62, p. 55 – 61, 2003.

AUSTIN, M.P.; MITCHELL, P.; GOODWIN, G.M. Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology. *Br J Psychiatry*.v.178, p.200-6, 2001.

AYALA, A. R. Antagonistas do hormônio liberador da corticotrofina: atualização e perspectivas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 46, p. 619-625, 2002.

BAGETTI, M., FACCO, E. M. P., PICCOLOI, J. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p. 147 – 154, 2011.

BASTING, R.T.; NISHIJIMA, C.M.; LOPES, J.A.; SANTOS, R.C.; LUCENA PÉRICO, L.; LAUFER, S.; BAUER, S.; COSTA, M.F.; SANTOS, L.C.; ROCHA, L.R.; VILEGAS, W.; SANTOS, A.R.; DOS SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *J Ethnopharmacol.* v.157, p.257-267, 2014.

BARREIROS, A.L. B. S., DAVID, J.M.; DAVID, J. P. Quím. Nova v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BAUER, M.E. Chronic stress and immunosenescence: a review. Neuroimmunomodulation v.15, p.241-250, 2008.

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A.C.; DEAN, O.M.; GIORLANDO, F.; BERK, M.; WADEE, A.A.; KUSCHKE, R.H.; O'NEILL-KERRN A. Acute phase proteins in major depression. J. Psychosom. Res., v. 43, p. 529-534, 1997.

BERK, M., COPOLOV, D. L., DEAN. O. LU, K.; JEAUVONS, S.; SCHAPKAITZ, I.; ANDERSON-HUNT, M.; BUSH, A.I. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder-a double-blind randomized placebo-controlled trial. Biological Psychiatry, v. 64, p. 468 – 475, 2008.

BENÖHR, H.C.; WALLER, H.D. Glutathione (author's transl) Klin Wochenschr. v.53,n.17, p.789-802, 1975.

BERTON, O., NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. Nature Review Neuroscience, p.137-51, 2006.

BEZERRA, J.E.F.; SILVA JUNIOR, J.F. DA.; LEDERMAN, I.E. Pitanga (Eugenia uniflora L.). Jaboticabal: FUNEP, Série Frutas Nativas, n.1, p.30, 2000.

BUTTERFIELD, D.A.; SULTANA, R. Methionine-35 of $\alpha\beta(1-42)$: importance for oxidative stress in Alzheimer disease. J Amino Acids, v.2011, 2011.

BRAMBILLA, P.; PEREZ, J.;BARALE, F.; SCHETTINI, G.; SOARES, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. Mol Psychiatry v.8, p.721-37, 2003.

BRUNEAU, E.G.; AKAABOUNE,M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. Molecular Neurobiologic. 34(2):137-51,2006.

CADENAS ; DAVIES. Free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, v.29, n.1, p.222-230, may./sep. 2000.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Curr. Opin. Psychiatry*, v. 19, n. 1, p. 25-33, 2006.

CASEY, B.J., RUBERRY, E.J., IBBY, V., GLATT, C.E., HARE, T., DUHOUX, S. et al. Transitional and translational studies of risk for anxiety. *Depress Anxiety*, v.28(1), p.18-28, 2011.

CHARNEY, D.S.; MANJI, H.K. Life Stress, Genes, and Depression: Multiple Pathways Lead to Increased Risk and New Opportunities for Intervention, *Science STKE*, v.225, p.1-11, 2004.

CHE, Y., WANG, J.F., SHAO, L., YOUNG, T. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. *J. Psychiatry Neuroscience* V.35, p.296-302, 2010.

CHINNI, S.; DUBALA, A.; KOSARAJU, J. KHATWAL, R.B.; SATISHKUMAR, M.N.; KANNAN, E. Effect of Crude Extract of *Eugenia jambolana* Lam. on Human Cytochrome P450 Enzymes. *Phytother Res.* v. 28 n.11, p.1731-1734, 2014.

CHUNG, C.P.; SCHMIDT, D.; STEIN, C.M.; Morrow, J.D.; Salomon, R.M. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment *Psychiatry Res* v.206, p.213-16, 2013.

CLARK, L.; CHAMBERLAIN, S.R.; SAHAKIAN, B.J. Neurocognitive mechanisms in depression: implications for treatment. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:57-74. [38] Deutsch JA. The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*. v.174, p.788-94, 1971.

COLLINS, P.Y. Grand challenges in global mental health: integration in research, policy and practice. *PLoS Medicine*, 2013.

CONNOR, T.J.; LEONARD, B.E. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci.*, v. 62, p. 583-606, 1998.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 81, p. 57-63, 2002.

CRYAN, J. F., MARKOU, A., Lucki, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, v.23(5), p.238-245, 2002.

CRYAN, J. F., MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*, v. 9, p.326-357, 2004.

CRYAN, J. F., HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, v. 4, p.775-790, 2005.

CULLINAN, W.E., HERMAN, J.P., BATTAGLIA, D.F., AKIL, H., WATSON, S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. v.64, p.477-505, 1995.

CUMURCU, B.E., OZYURT, H., ETIKAN, I. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*.v.63, p.639-645, 2009.

D'AQUILA, P.S., BRAIN, P., WILLNER, P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & Behavior*, p.861-7, 1994.

DAGYTE, G.; VAN DER ZEE, E.A., POSTEMA, F., LUITEN, P.G., DEN BOER, J.A., TRENTANI, A., et al. Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience*. V.162, p.904-13, 2009.

DA SILVA, L.C.P., CHUMBINHO, L.C.,PIZZINI, C.C., BATISTA, W.S., OLIVEIRA, F.S., OLIVEIRA, G.M. Uso de animais de laboratório como modelos experimentais para estudo de transtorno psiquiátricos. RESBCAL, v.1 n.3, p. 270-278. 2012.

DE KLOET, E.R., JOELS, M., HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci. v.6, p.463-75, 2005.

DESA, I., Dietary Polyphenols as Potential Remedy for Dementia.Adv. Neurobiol.12: 41-56, 2016.

DIMOPOULOS, N., PIPERI, C., PSARRA, V., LEA, R.W., KALOFOUTIS, A. Increased plasma levels of 8-iso-PGF2alpha and IL-6 in an elderly population with depression. Psychiatry Res. V.161, p.59-66, 2008.

DONADIO, L.C.; MORO, F.V.; SERVIDONE, A.A. Frutas Brasileiras. Jaboticabal: Novos Talentos, p.288, 2002.

EGASHIRA, N, MATSUMOTO, Y., MISHIMA, K., IWASAKI, K., FUJIOKA, M., MATSUSHITA, M., et al. Low dose citalopram reverses memory impairment and electroconvulsive shock-induced immobilization. Pharmacol Biochem Behav. v.83, p.161-7, 2006.

ELLAH, M. R. A. The Role of Liver Biopsy in Detection of Hepatic Oxidative Stress.

ELLENBROEK, B. A. ; COOLS, A. R. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol*, 1, p.469-490, 1990.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. v28, p.435-451, 2004.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, V., ANDRES, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7, 88-95,1961.

EMRICH, H.M., VON ZERSSEN D., KISSLING, W., MOLLER, H.J., WINDORFER, A. Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders .v.229,p.1-16, 1980.

ENGERS, V.K., BEHLING, C.S.FRIZZO, M.N. A influencia do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. Revista contexto e saúde, v.10, n.20, p.93-102, 2011.

EPSTEIN, I.; SZPINDELA, I.; KATZMANA, M.A. Pharmacological approaches to manage persistent symptoms of major depressive disorder: rationale and therapeutic strategies, Psychiatric research, v.220, p. 15-33, 2014.

EREN, I., NAZIROGLU, M., DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. Neurochemical Research, v. 32, p. 1188 – 1195, 2007.

EVANS, D.L.; CHARNEY, D.S.; LEWIS, L. et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. Biol Psychiatry v.58, p.175-189, 2005.

FAQUETI, L.G.; PETRY, C.M.; MEYRE-SILVA, C.; MACHADO, K.E. MACHADO, K.E.; CRUZ, A.B.; GARCIA, P.A.; CECHINEL-FILHO, V.; SAN FELICIANO, A.; MONACHE, F.D. Euglobal-like compounds from the genus *Eugenia*. Nat Prod Res. v27, p. 28-31, 2013.

FERREIRA, P.K. Ação antidepressiva do zinco no teste do nado forçado: uma abordagem farmacológica. Universidade Federal de Santa Catarina, mestrado em neurociências, 2004.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, Rev. Assoc. Med. Bras. vol.43 n.1, 1997.

FIGUEIRÔA, E.O.; DA SILVA, L.C.N.; DE MELO, C.M.L. LEMOINE NEVES, J.K.A.; DA SILVA, N.H.; PEREIRA, V.R.A.; CORREIA, M.T.D. Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of Fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.:

Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content. The Scientific World Journal, 2013.

FINKELSTEIN, Y., KOFFLER, B., RABEY, J.M., GILAD, G.M. Dynamics of cholinergic synaptic mechanisms in rat hippocampus after stress. Brain Res. v.343,p.314-9, 1985.

FIUZA, T. S. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Revista Eletrônica de Farmácia. v. 5, p. 21 – 31, 2008.

FOUQUÉ, A. Les plantes médicinales présentes en Fôret Guyanaise. Fruits, v.36, n.10, p. 567-592, 1981.

FORLENZA, M.J., MILLER, G.E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. Psychosom. Med. V.68, p.1-7, 2006.

GALECKI, P., SZEMRAJ, J., BIENKIEWICZ, M., FLORKOWSKI, A., GALECKA, E., 2009. Lipidperoxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. Pharmacol. Rep. v.61, p. 436-447,2009.

GARDNER, A.; BOLES, R. G. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry, special issue, 2010.

GAYNES, B.N., WARDEN, D., TRIVED, M.H., WISNIEWSKI S.R., FAVA M., RUSH, A.J., What did STAR*D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. Psychiatric Services v.60(11), p.1439-1445, 2009.

GILAD, G.M. The stress-induced response of the septo-hippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoneuroendocrinological interactions. Psychoneuroendocrinology. v.12,p.167-84, 1987. GREENFIELD, S.A., VAUX, D.J. Parkinson's disease, Alzheimer's disease and motor neuron disease: identifying a common mechanism. Neuroscience. 113:485-492, 2002.

GOLD, P.E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.* v.80, p.194-210, 2003.

GREEK, R.; SHANKS, S. Animal Models in Light of Evolution. *Rev. Bras. Psiquiatr.* v.24, n.4 ,2002.

GU, F.; ZHU, M.; SHI, J.; HU, Y.; ZHAO, Z. Enhanced oxidative stress is an early event during development of Alzheimer-like pathologies in presenilin conditional knock-out mice. *Neuroscience Letters*, v.440, p.44-48, 2008.

GU, F.; CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Glutathione redox imbalance in brain disorders *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.2014.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives in Toxicology*, v. 86, p. 345 – 391, 2012.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 4 ed, 2007.

HENN, F.A., VOLLMEYER, B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biological Psychiatry*, p.146-50, 2004.

HEUSER, I. Depression, endocrinologically a syndrome of premature aging? *Maturitas* v.41, p.S19-S23, 2002.

HERKEN, H., GUREL, A., SELEK, S. ARMUTCU, F.; OZEN, M.E.; BULUT, M.,; KAP, O.; YUMRU, M.; SAVAS, H.A.; AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Archives of Medical Research*, v. 38, p. 247 - 252, 2007.

HIRSCHFELD, R.M.A. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *Journal Clinical Psychiatry*, v. 61, n.6, p. 4-6, 2000. KENDLER, K.S.ZACHAR, P.; CRAVER, C. What kinds of things are psychiatric disorders? *Psychological Medicine* v.1, p.1143-1150, 2011.

HOLMSTRÖM, K.M., FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.15, p. 411-421, 2014.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, p.1170-1179, 2008.

INSEL, T.R. From animal models to model animals. *Biol Psychiatry*, v.62, p. 1337-1339, 2007.

JANOWSKY, D.S.; DAVIS, J.M.; EL-YOUSEF, M.K.; SEKERKE, H.J. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. *The Lancet*. P.632-635.1972.

JENSEN, O., LISMAN, J.E. Position reconstruction from an ensemble of hippocampal place cells: contribution of theta phase coding. *J Neurophysiol*. v. 83, p.2602-2609, 2000.

JOHN, K.M.; AYYANAR, M.; JEEVA, S. Metabolic variations, antioxidant potential, and antiviral activity of different extracts of *Eugenia singampattiana* (an endangered medicinal plant used by Kanitribals, Tamil Nadu, India) leaf. *Biomed Research International* 2014.

JONES, C.A., WATSON, D.J., FONE, K.C. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol*, v.164(4), p.1162-1194, 2011.

KATO, T., KUBOTA, M., KASAHARA, T. Animal models of bipolar disorder. *Neuroscience Bio Behavior Review*, p.832-42, 2007.

KENDLER, K.S.ZACHAR, P.; CRAVER, C. What kinds of things are psychiatric disorders? *Psychological Medicine* v.1, p.1143-1150, 2011.

KESSLER, R.C. The costs of depression. *The psychiatric clinics of North America*. V.1: 1-4, 2012.

KIM, J.J., DIAMOND, D.M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity, lost memories. *Nat Rev Neurosci.* v.3, p.453-462, 2002.

KUHN, R. From imipramine to levoprotiline: The discovery of antidepressants. In: Healey D, editor. *The psychopharmacologists. II: Interviews by DR David Healey.* Ondon: Arnold. p.93-118, 1999.

LA FOLLETTE, H., SHANKS .N. Animal models in biomedical research: some epistemological worries. *Public Aff, Q7*, p.113-130, 1993.

LAGE, J.T. *Neurobiologia da depressão. Mestrado integrado em Biomedicina.* Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, 2009.

LEE, S.Y.; LEE, S.J.; HAN C, PATKAR, A.A.; MASAND, P.S.; PAES, C.U. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: Targets for novel antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 46, 224-235, 2013.

LEONARD, B.E.; SONG C. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* V.54; p.299-303, 1996.

LEONARD, B.E.; SONG C. Stress, depression, and the role of cytokines. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 461, p. 251-265, 1999.

LINDQVIST, D.; JANELIDZE, S.; HAGELL, P.; ERHARDT, S.; SAMUELSSON, M.; MINTHON, L. Interleukin-6 is elevated in the cerebrospinal fluid of suicide attempters and related to symptom severity. *Biol. Psychiatry*, v. 66, p. 287-292, 2009.

LOPES GALENO, D.M.; CARVALHO, R.P.; BOLETI, A.P.; LIMA, A.S.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, P.D.; PACHECO, C.C.; PEREIRA DE SOUZA, T.; LIMA, E.S. Extract from *Eugenia punicifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. *Appl Biochem Biotechnol.* v.172, n.1, p.311-24, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LUCCA, G., COMIM, C.M., VALVASSORI, S.S., REUS, G.Z., VUOLO, F., PETRONILO, F., DAL-PIZZOL, F., GAVIOLI, E.C., QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International* v.54, p.358-362, 2009.

LURIE, M. The enigma of isoniazid, In:Healey D, editor.The psychopharmacologists. II:Interviews by Dr David Healey.London: Arnold. p.119-134, 1999.

MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; JONCKHEERE, C.; RAUS, J. Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. *Neuropsychobiology*, v. 24, n. 3, p. 115-120, 1990-1991.

MAES, M.; BOSMANS, E.; MELTZER, H. Y.; SCHARPE, S.; SUY, E. Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am. J. Psychiatry*, v. 150, n. 8, p. 1189-1193, 1993.

MAES M, BOSMANS E, SUY E, VANDERVORST C, DE JONCKHEERE C, RAUS J. Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. *Neuropsychobiology*. v.2, n.3, p.115-20, 1990-1991.

MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; DEJONCKHEERE, C.; RAUS, J. Depression-related disturbances in mitogen-induced lymphocyte responses and interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor production. *Acta Psychiatr. Scand.*, v. 84, n. 4, p. 379-386, 1991.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 461, p. 25-46, 1999.

MAES, M.; YIRMYIA, R.; NORABERG, J.; BRENE, S.; HIBBELN, J.; PERINI, G.; KUBERA, M.; BOB, P.; LERER, B.; MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative

(I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.*, v. 24, n. 1, p. 27-53, 2009c.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, special issue, 2010.

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.; YIRMYIA, R.; NORABERG, J.; BRENE, S.; HIBBELN, J.; PERINI, G.; KUBERA, M.; BOB, P.; LERER, B; MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.*, v. 24, n. 1, p. 27-53, 2009.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*.V.35, p.676-692, 2011.

MARNETT, L.J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. v.181-182:219-222, 2002.

MARINHO, M.M., DE SOUSA, F.C., DE BRUIN, V.M., VALE, M.R., VIANA, G.S. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochem Int.* v.33, p.299-306,1998.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Cienc. Cult.* v.66, n.3, 2014.

MCARTHUR,R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.84, 436-452, 2006.

MCEWEN, B.S. Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Ann NY Acad Sci*. v.746, p.134-142, 1994.

MCGONIGLE, P. Animal Models of CNS Disorders. *Biochemical Pharmacology*. In Press. 2013.

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

MELLO, A.F.; JURUENA, M.F.; PARIANTE, C.M.; TYRKA, A.R.; PRIVE, L.H.; CARPENTER, L.L.; DEL PORTO, J.A. Depressão e estresse: existe um endofenótipo? *Revista Brasileira de Psiquiatria* v.29(SI):S13-18, 2007.

MELLO, B.S.F. Determinação dos efeitos da doxiciclina em um modelo de depressão induzido Lipolissacarideo em camundongos.Faculdade de medicina da aUniversidade do Ceara. Mestrado em microbiologia médica, 2012.

MEO, S.D., REED, T.T., VENDITTI, P., VICTORS,V.NM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

MESHORER, E., et al .Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science*. v.295, p.508-512, 2002.

MICHEL, T.M.; FRANGO, S.; THIEMEYER, D.; CAMARA, S.; JECHEL, J.; NARA, K.; BRUNKLAUS, A.; ZOECHLING, R.; RIEDERER, P. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder: a postmortem study. *Psychiatry Res* v.151, p.145-50, 2007.

MIKOVA, O.; YAKIMOVA, R.; BOSMANS, E.; KENIS, G.; MAES, M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, v. 11, n. 3, p. 203-208, 2001.

MOYLAN, S.; L BERK, M.; DEAN, O.M. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? Neuroscience and Biobehavioral Reviews. v.45 p.46-62, 2014.

MORRIS, G.; ANDERSON, G.; DEAN, O.; BERK, M.; GALECKI, P.; MARTIN-SUBERO, M.; MAES, M. The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. Mol Neurobiol. v. 50, p.1059-1084, 2014.

NAIR, U.; BARTSCH, H.; NAIR, J. Lipidic peroxidation- induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. Free Radical Biology and Medicine. v.43, p.1109-1120, 2007.

NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 5 ed., Porto Alegre, ARTMED, 2011.

NESTLER, E.J., BARROT, M., DILEONE, R.J., EISCH, A.J., GOLD, S.J., MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. Neuron journal, p.13-25, 2002.

NIJHOLT, I., FARCHI, N., KYE, M., SKLAN, E.H., SHOHAM, S., VERBEURE, B., OWEN, D., HOCHNER, B., SPIESS, J., SOREQ, H., BLANK, T. Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. Molecular Psychiatry 9:174-183, 2004.

PALTA, P.; SAMUEL, L.J.; MILLER, E.R.; et al. Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. Psychosom Med v.76, p.12-19, 2014.

PEREIRA T. K.; CHAVES C. C.; MACHADO, N. C.; FLORIANI N.; MORO, R. S. Fitosociologia do criadouro comunitário do faxinal taquari dos Ribeiros, PR. In: Seminário Internacional em Ciência e Tecnologia . 1., 2009, Cascavel. **Anais...** Cascavel: UNIOESTE. p. 1, 2009.

POLLAK, D.D., REY, C.E., MONJE, F.J. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. Ann Med, v.42(4), p.252-64, 2010.

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

PRADO, L.C.; SILVA, D.B.; DE OLIVEIRA-SILVA, G.L. HIRAKI, K.R.; CANABRAVA, H.A.; BISPO-DA-SILVA, L.B. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. *Biol Pharm Bull.* V.37, n.5, p.722-30, 2014.

RADA, P., COLASANTE, C., SKIRZEWSKI, M., HERNANDEZ, L., HOEBEL, B. Behavioral depression in the swim test causes a biphasic, longlasting change in accumbens acetylcholine release, with partial compensation by acetylcholinesterase and muscarinic-1 receptors. *Neuroscience.* v.141, p.67-76, 2006.

RAHAL, A.; KUMAR,a.;Singh,V.;YADAV,B.;TIWARI, R.; CHAKRABORTY,S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Pooxidants, and Antioxidants:The Interplay. *BioMed Research International*.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M..2011 Drogas que Inibem a Cholinesterase. 4a edição, Guanabara Koogan, 110-115, 2011.

RATTMANN, Y.D.; DE SOUZA, L.M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S.M. DARTORA, N,.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012.

RINWA, P., KUMAR, A. Modulation of nitergic signaling pathway by americian ginseng attenuates chronic unpredictable stress induced cognitive impairment, neuroinflammation, an biochemical alterations. *Arch Pharmacol* v.387, p.129-141, 2014.

RINWA, P., KUMAR, A. Quercetin along with piperine prevents cognitive dysfunction, oxidative stress and neuro-inflammation associated with mouse model of chronic unpredictable stress. *Archives of Pharmacol Research.* p. 1-10, 2013.

ROWNTREE, D.W., NEVIN, S., WILSON, A. J. Neurol. Neurosurg.Psychiatric. v.13, p.47,1950.

ROTHSCHILD, A.J., DUNLOP, B.W., DUNNER, D.L., FRIEDMAN, E.S., GELENBERG, A.,HOLLAND, P., KOCSIS, J.H., KORNSTEIN, S.G., SHELTON, R., TRIVEDI, M.H., ZAJECKA ,J.M., GOLDSTEIN, C., THASE, M.E., PEDERSON, R., KELLER, M.B. Assessing rates and predictors of tachyphylaxis during the prevention of recurrent episodes of depression with venlafaxine ER for two years (PREVENT) study.Psychopharmacology Bulletin v.42(3), p.5-20, 2009.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SANACORA, G.; ZARATE, C. A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. Nat. Rev. Drug Discov., v. 7, p. 426-437, 2008.

SANCHONETE, M. C.C. Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana. Porto Alegre. FEPLAM, p.311,1985.

SCHIEPERS, O.J, WICHERS, M.C, MAES, M. Cytokines and major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. v. 29, p. 201-217, 2005.

SCHILDKRAUT,JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. Am J Psychiatry. v.122, p.509-522, 1965.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. RBME. v.10, n.10, p.308-13, 2004.

SONG, C.; LIN, A.; BONACCORSO, S.; HEIDE, C.; VERKERK, R.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; SCHARPE, S.; WHELAN, A.; COSYNS, P.; JONGH, R.; MAES, M. The inflammatory response system and the availability of plasma tryptophan in patients with primary sleep disorders and major depression. J. Affect Disord., v. 49, n. 3, p. 211-219, 1998.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread-making products. *Ciênc Agrotecnol* v.28, p.685-90,2004.

SOUZA, J.A., SCHUCH, M.W., SILVA, L.C., FERRI, J., SOARES, G.C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação in vitro de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Revista Brasileira de Agrociência*. v.13(1): p.115-118, 2007.

SIES, H. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, New York, 1991.

SILVA, W.J.M., FERRARI, C.K.B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento Mitocôndria, Radicais livres e Envelhecimento. p.441-451, 2011.

SINVASINPRASAN, S., PANTAN, R., THUMMAYOT, S., TOCHARUS, J., SUKSAMRAM, A., TOCHARUS, C. Cyanidin-3-glucoside attenuates angiotensin II-induced oxidative stress and inflammation in vascular endothelial cells. *Chem Biol Interact.* (16)30510-30515, 2016.

SIWEK, M.; SOWA-KUCMA, M.; DUDEK, D. STYCZEŃ, K.; SZEWCZYK, B.; KOTARSKA, K.; MISZTAK, P.; PILC, A.; WOLAK, M.G.; NOWAK, G. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacological Reports* v.65, p.1558-71, 2013.

SPECK, C.E.; KUKULL, W.A.; BRENNER, D.E. BOWEN, J.D.; MCCORMICK, W.C.; TERI, L.; PFANSCHMIDT, M.L.; THOMPSON, J.D.; LARSON, E.B. History of depression as a risk factor for Alzheimer's disease. *Epidemiology* v. 6, p.366-369, 1995.

SREEKUMAR, P.G.; HINTON, D.R.; KANNAN, R. Methionine sulfoxide reductase A: Structure, function and role in ocular pathology. *World J. Biol. Chem.* V. 2, p.184-192. 2011.

SRIKUMAR, B.N., RAJU, T.R., SHANKARANARAYANA RAO, B.S. The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats. *Neuroscience*. v.143, p.679-88, 2006.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread-making products. *Ciência Agrotecnologica* v.28, p.685-90,2004.

THOMAS, A.J.; DAVIS, S.; MORRIS, C.; JACKSON, E.; HARRISON, R.; O'BRIEN, J.T. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *Am. J. Psychiatry*, v. 162, p.175-177, 2005.

TIMBRELL, J. Principles of biochemical toxicology. 3 ed., Londres: Taylor & Francis, 2000.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 44 - 84, 2006.

VALVASSORI, S.S., BUDNI, J., VARELA, R.B., QUEVEDO, J., Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, p.S121-131. 2013.

VANWEST, D.; MAES, M. Activation of the inflammatory response system: a newlook at the etiopathogenesis of major depression. *Neuro Endocrinol. Lett.*, v. 20, p. 11-17, 1999.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.15 p. 361-372, 2005.

VENTURA, AL.M.; ABREU, P.A.;FREITAS, R.C.C.;SATHER, P.C.; LOUREIRO,N.; CASTRO,H.C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulacao e a relacao

com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. Rev Psiq Clín. v.37(2):66-72, 2010.

VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L. GELSON PERIN, G.; R.G.; ALVES, D.; DA SILVA, W.P.; MOTTA, A.D.S.; NASCENTE, P.D.S. Eugenia uniflora L. Antioxidant and antimicrobial properties. Food and Chemical Toxicology. v.50, p.2668-2674, 2012.

VICTORIA, F.N.; BRAHM, A.D.S.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E.J. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of E. uniflora L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. Neuroscience Letters. v. 544, p.105-109, 2013.

VICTORIA, F.N.; ANVERSA, R.G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E.J. Essential oils of E. uniflora leaves protect liver injury induced by acetaminophen. Food Bioscience, p. 450 – 457, 2013.

WANG, X.; ZAIDI, A.; PAL, R; GARRETT, A.S. Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. BMC Neurosci, v.10, p.12, 2009.

WANG, SM.; HAN, C.; LEE, S.J.; PATKARD, A.A.; MASANDE, P.S.; PAEAD, CU. Five potential therapeutic agents as antidepressants: a brief review and future directions. Expert Rev Neurother. 15(9), 1015-1029, 2015.

WILLIAMS, C.N.; CHEW, W.Y.; RAJARATNAM, J.A. Tree and field crops of the wetter regions of the tropics. Longman Scientific & Technical, 1987. 262p.

WILLNER, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. Prog NeuroPsychoph. v.10 , n.6, p.677-90, 1986.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology. p.319-29, 1997.

WILLNER, P., MUSCAT, R., PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience Biobehavior Review*.p.525-34, 1992.

WILLNER, P., SCHELL-KRUGER., BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.37:2331-2371, 2013.

WILSON, M.A., MCNAUGHTON, B.L. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*. v.261, p.1055-1058, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Depression.

Disponível em : < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>> Acesso em: 20.01.17.a

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Health topics: Depression.

Disponível em: < <http://www.who.int/topics/depression/en/>> Acesso em : 20 03.2017.b

WOLKOWITZ, O.M.; EPEL, E.S.; REUS,V.I.; MELLON, S.H. Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? *Depression anxiety* v. 27, n.4, p.327-338, 2010

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

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M.The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression.*Acta Neuropsychiatr* v.16, p.200-203, 2004.

XU, L., HOLSCHER, C., ANWYL, R., ROWAN, M.J. Glucocorticoid receptor and protein/RNA synthesis-dependent mechanisms underlie the control of synaptic plasticity by stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.95, p.3204-3208,1998.

ZAFIR, A.; BANU, N.Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J Biochem Biophys*. v.46, p.53-58, 2009.

ZARATE, C.A.; MANJI, H.K. The role of AMPA receptor modulation in the treatment of neuropsychiatric diseases. Clin. Exp. Neurology, v. 211, p. 7-10, 2008.

ZUNSZAIN PA, ANACKER C, CATTANEO A, CARVALHO LA, PARIANTE CM. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. v. 35, p. 722-729, 2011.

ZUNSZAIN, P. A.; HEPGUL, N.; PARIANTE, C. M. Inflammation and Depression. Curr. Top. Behav. Neurosci., v. 14, p. 135-151, 2013.

ZOU, W.; ROTH, R. A.; YOUNIS, H. S.; BURGOON, L. D.; GANEY, P. E. Oxidative stress is important in the pathogenesis of liver injury induced by sulindac and lipopolysaccharide cotreatment. Toxicology, 272:32-38, 2010.

Anexo



Pelotas, 14 de setembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Avaliação farmacológica de compostos naturais em modelos animais de transtornos do humor**”, processo nº23110.004609/2015-09 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4609-2015).

Vigência do Projeto: 15/09/2015 a 31/12/2018

Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/Wistar e *Mus musculus*/Swiss

Nº de animais: 312 de cada espécie

Idade: 60 dias

Sexo: Machos

Origem: Biotério Central/Ufpel



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: 09/10/2015
Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello