

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – CCQFA
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Investigação do papel preventivo do ácido tânico frente ao modelo de
Transtorno Depressivo Maior induzido por lipopolissacarídeo em
camundongos**

Karina Pereira Luduvico

Pelotas, 2020

Karina Pereira Luduvico

**Investigação do papel preventivo do ácido tânico frente ao modelo de
Transtorno Depressivo Maior induzido por lipopolissacarídeo em
camundongos**

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 Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador(a): Prof^a. Dra. Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L944i Luduvico, Karina Pereira

Investigação do papel preventivo do ácido tânico frente ao modelo de Transtorno Depressivo Maior induzido por lipopolissacarídeo em camundongos / Karina Pereira Luduvico ; Francieli Moro Stefanello, orientadora. — Pelotas, 2020.

75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Polifenol. 2. Neuroinflamação. 3. Estresse oxidativo. 4. Depressão. 5. Camundongos. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Karina Pereira Luduvico

Investigação do papel preventivo do ácido tânico frente ao modelo de Transtorno
Depressivo Maior induzido por lipopolissacarideo em camundongos

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

Data da Defesa: 18 de fevereiro de 2020

Banca examinadora:

Francieli Moro Stefanello

Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (Orientadora)

Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

César Augusto Brüning

Prof. Dr. César Augusto Brüning

Doutor em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.

Jucimara Baldissarelli

Prof^a Dr^a. Jucimara Baldissarelli

Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.

Agradecimentos

Muitas pessoas foram essenciais na minha caminhada e também na execução do trabalho. Com muita ajuda, pude finalizar mais uma etapa com muita felicidade e orgulho de ter chegado até aqui.

Agradeço aos meus pais Herwerthon e Ana pela dedicação, pelo incentivo aos estudos e por permitirem fazer minhas escolhas pessoais e profissionais com apoio incondicional. Amo muito vocês.

Ao meu namorado Anderson, muito obrigada pela companhia, paciência e carinho todos os dias. Te amo muito.

Agradeço minha sogra Adriana, pelo carinho de sempre e por fazer parte da minha vida.

Agradeço também minhas amigas de longa data, Natália, Vic, Alessandra, Bruna, Cássia, Glória... que estão sempre ao meu lado.

Agradeço a toda equipe dos laboratórios Neurocan e Biomarcadores. Um agradecimento especial para as gurias: Luiza, Fernanda, Julia, Nati Bona, Nati Pedra, Mayara, Juliane... São só alguns dos nomes da nossa grande equipe! Todos são especiais e agradeço imensamente pela ajuda na execução desse trabalho e pela convivência. Aprendi e aprendo muito com vocês.

Um agradecimento especial à minha orientadora Fran, pela confiança e pela oportunidade de ter desenvolvido esse projeto. És uma orientadora e professora incrível. Obrigada pelo incentivo e por ser tão atenciosa comigo. Um grande exemplo e inspiração para mim!

Por fim, agradeço a UFPel, professores e funcionários do PPGBBio, e a Capes pela bolsa concedida.

Resumo

LUDUVICO, Karina Pereira. **Investigação do papel preventivo do ácido tânico frente ao modelo de Transtorno Depressivo Maior induzido por lipopolissacarídeo em camundongos, 2020.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma enfermidade neuropsiquiátrica multifatorial muito comum, que atualmente acomete cerca de 350 milhões de pessoas no mundo. Existem diferentes hipóteses acerca da fisiopatologia desse transtorno, sendo uma delas referente ao estresse oxidativo. Sabe-se que a sinalização redox desregulada é crucial na fisiopatologia e na neuroprogressão dessa doença. O ácido tânico (AT) é um polifenol produzido pelo metabolismo secundário de plantas e faz parte do grupo dos taninos hidrolisáveis. Os taninos são substâncias fenólicas que apresentam diversas atividades farmacológicas, dentre elas destacam-se atividades antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antidepressivo e antioxidante do AT em um modelo animal de depressão induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, os camundongos receberam água ou AT (30 mg/kg ou 60 mg/kg) por via intragástrica durante 7 dias, sendo realizada a administração de LPS (830 µg/kg) no último dia de tratamento. Após 24 horas, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF), teste do campo aberto (TCA), teste de suspensão da cauda (TSC) e teste de borrifagem por sacarose (TBS), e eutanasiados para remoção das estruturas cerebrais e posterior avaliação de parâmetros bioquímicos. A endotoxina induziu um comportamento tipo-depressivo nos animais, o qual foi atenuado pela administração prévia de AT. No córtex cerebral, hipocampo e estriado, o LPS aumentou a peroxidação lipídica e a produção de espécies reativas de oxigênio, parâmetros que também foram prevenidos pela administração de AT. Esse composto fenólico também preveniu uma diminuição da atividade da catalase no estriado. Além disso, o LPS aumentou os níveis de TNF- α em todas as estruturas cerebrais, e o aumento foi prevenido apenas no córtex cerebral pelo tratamento com AT. Em conclusão, o AT demonstrou propriedades neuroprotetoras, com efeitos antioxidante, anti-inflamatório e antidepressivo em modelo animal agudo de TDM. Portanto, esse composto poderia fornecer uma abordagem alternativa para a prevenção e/ou tratamento dessa patologia.

Palavras-chave: Polifenol. Neuroinflamação. Estresse oxidativo. Depressão. Camundongos.

Abstract

LUDUVICO, Karina Pereira. **Investigation of the preventive role of tannic acid against the model of the Major Depressive Disorder induced by lipopolysaccharide in mice, 2020.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Major Depressive Disorder (MDD) is a very common multifactorial neuropsychiatric disorder that currently affects around 350 million people worldwide. There are different hypotheses about the pathophysiology of this disorder, one of them being about oxidative stress. It is known that deregulated redox signaling is crucial in the pathophysiology and neuroprogression of this disease. Tannic acid (TA) is a polyphenol produced by the secondary metabolism of plants and is part of the group of hydrolysable tannins. Tannins are phenolic substances that present several pharmacological activities, among them antimutagenic, anticarcinogenic and antioxidant activities. Considering the above, the objective of this project was to evaluate the antidepressant and antioxidant effect of TA in an animal model of lipopolysaccharide (LPS)-induced depression. For this, mice received water or TA (30 mg/kg or 60 mg/kg) intragastric route for 7 days, with the administration of LPS (830 µg/kg) on the last day of treatment. After 24 hours, the animals were submitted to forced swimming (TNF), open field (OFT), tail suspension (TST) and splash tests (ST), and euthanasia for removal of the brain structures and subsequent evaluation of biochemical parameters. The endotoxin induced depressive-like behavior in these mice and this was attenuated by TA pretreatment. In the cerebral cortex, hippocampus, and striatum, LPS increased lipid peroxidation and reactive oxygen species production, and this was also prevented by TA administration. TA treatment also prevented a decrease in catalase activity within the striatum. Further, LPS administration caused increased levels of TNF- α in all brain structures, and this was prevented in the cortex by TA treatment. In conclusion, TA shows many neuroprotective properties, with demonstrated antioxidant, anti-inflammatory and antidepressant effects in this animal model of MDD. Therefore, this compound could provide an alternative therapeutic approach for the treatment and/or prevention of this pathology.

Keywords: Polyphenol. Neuroinflammation. Oxidative stress. Depression. Mice.

Lista de figuras

Figura 1	Esquema demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo no TDM	10
Figura 2	Processos mitocondriais alterados no TDM	11
Figura 3	Funcionamento do eixo HPA	13
Figura 4	Mecanismos inflamatórios e TDM	15
Figura 5	Microglia e distúrbios na homeostase tecidual	18
Figura 6	Eventos envolvidos no processo neuroinflamatório	18
Figura 7	Estrutura do lipopolissacarídeo (LPS)	20
Figura 8	Estrutura do ácido tânico (AT)	22

Lista de tabelas

Tabela 1	Classes de fármacos utilizados para o tratamento do TDM	8
-----------------	---	---

Lista de Abreviaturas

5-HT	Serotonina
AChE	Acetilcolinesterase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AT	Ácido Tânico
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DA	Dopamina
DM	Depressão Maior
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
Gr	Glutathione redutase
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IMAOs	Inibidores da Monoamina Oxidase
INF	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IRDN	Inibidores da Recaptação de Dopamina e Noradrenalina
IRSN	Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina

ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
KA	Ácido quinurênico
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Na ⁺ -K ⁺ ATPase	Bomba de sódio-potássio
NE	Noradrenalina
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
MDA	Malondialdeído
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Proteína C reativa
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Teste do campo aberto
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TLR-4	Receptor do tipo Toll-4
TNF	Teste do nado forçado
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSC	Teste de suspensão da cauda

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Justificativa.....	3
3. Objetivo Geral.....	4
3.1 Objetivos Específicos.....	4
4. Revisão Bibliográfica.....	5
4.1 Transtorno Depressivo Maior (TDM).....	5
4.2 Tratamentos disponíveis para o TDM.....	7
4.3 Hipóteses do TDM.....	8
4.3.1 Hipótese do estresse oxidativo.....	8
4.3.2 Hipótese monoaminérgica.....	11
4.3.3 Hipótese da desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)	12
4.3.4 Hipótese inflamatória.....	14
4.4 Envolvimento da neuroinflamação no TDM.....	16
4.5 Modelos animais para o TDM.....	19
4.5.1 Lipopolissacarídeo.....	19
4.6 Ácido Tânico	21
5. Manuscrito.....	24
6. Considerações finais.....	54
7. Referências.....	55
8. Anexos.....	61

1. Introdução

A Depressão Maior (DM), também conhecida como Transtorno Depressivo Maior (TDM), é uma desordem neuropsicológica de alta prevalência e uma das mais debilitantes, que resulta em problemas psicossociais e perdas econômicas, gerando despesas para os sistemas de saúde (MOUSSAVI et al., 2007; De VOS et al., 2017). Essa patologia afeta pessoas independentemente de idade, raça, etnia e gênero, resultando em efeitos adversos na saúde física, nas relações humanas e na função cognitiva (JESULOLA et al., 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo são acometidas pela DM (OMS, 2017). O TDM é multifatorial com influências ambientais, psicológicas e genéticas (HEPGUL et al., 2013). Diversas pesquisas abordam possíveis hipóteses relacionadas a esse transtorno, como a redução de neurotransmissores monoaminérgicos, estresse oxidativo, ativação do sistema imunológico e disfunções endócrinas (JESULOLA et al., 2018; MURRI et al., 2014; BLACK et al., 2015; SHARIQ et al., 2019).

Por se tratar de uma doença multifatorial e heterogênea, existem limitações no delineamento preciso dos mecanismos neurobiológicos relacionados a fisiopatologia da DM. O uso de tecidos de pacientes depressivos possuem um valor limitado, além da baixa disponibilidade dessas amostras (WANG et al., 2017). Nesse contexto, os modelos animais podem contribuir na resolução de questões biológicas (ANDERSEN & WINTER, 2017) de modo a mimetizar aspectos do comportamento cognitivo que assemelham-se a depressão em humanos (WANG et al., 2017). Existem diversos estudos na literatura a respeito de modelos animais do TDM e os indutores utilizados. Dentre esses, podem-se citar a exposição aguda ou crônica ao estresse, administração exógena de glicocorticoides, citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β , por exemplo), lipopolissacarídeo (LPS), além de modelos geneticamente modificados (KRISHNAN & NESTLER, 2011; WANG et al., 2017).

O ácido tânico (AT) é um polifenol que apresenta uma molécula de glicose na parte central, além de cinco cadeias de ácido gálico ligadas por esterificação. Esse composto é produzido pelo metabolismo secundário de plantas e faz parte do grupo dos taninos hidrolisáveis. Os taninos são substâncias fenólicas que apresentam diversas atividades farmacológicas, dentre elas destacam-se atividades antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante (BRANDÃO et al., 2008; MATTOS, 2009). Sabe-se que a capacidade antioxidante do AT está relacionada ao seu

potencial quelante de íons ferro (Fe^{2+}). Esses são moléculas pró-oxidantes, capazes de dar origem a radicais livres e desencadear a peroxidação lipídica. Ao reduzir os níveis desse metal, o AT pode diminuir a formação de espécies reativas via reação de Fenton, amenizando o estresse oxidativo. O AT pode também eliminar radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) através de seus grupos fenólicos que atuam como nucleófilos eficientes (JIMOH et al., 2016; LOPES et al., 1999).

As principais classes de fármacos utilizados atualmente para o TDM incluem os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS); inibidores da recaptação da serotonina e noradrenalina (IRSN); inibidores seletivos da recaptação da noradrenalina; antidepressivos tricíclicos; inibidores da recaptação de dopamina e noradrenalina e inibidores da monoamina oxidase (IMAOs) (CLEARE & DUNCKO, 2016). Entretanto, uma significativa parte dos pacientes depressivos (20-30%) não respondem a esses medicamentos, o que pode ocorrer devido ao conhecimento limitado a respeito dos mecanismos relacionados ao TDM (WANG et al., 2017). Além disso, mesmo quando o paciente é diagnosticado e tratado, as melhores taxas de remissão com antidepressivos padrão são de apenas 30% a 40% (KRISHNAN & NESTLER, 2011).

Uma vez que os tratamentos farmacológicos disponíveis para a DM funcionam alterando a transmissão monoaminérgica (BERTON & NESTLER, 2006; KRISHNAN & NESTLER, 2011), é possível que apenas um tipo de alteração esteja sendo tratado, excluindo casos relacionados a outros mecanismos, demonstrando que a teoria das monoaminas não é suficiente para elucidar todas as modificações apresentadas no TDM (BELMAKER & AGAM, 2008; KRISHNAN & NESTLER, 2011).

2. Justificativa

Um tratamento medicamentoso deve reunir diversas características importantes, como poucos efeitos adversos, eficácia, tolerabilidade e rapidez no início da ação. Diante do que foi exposto sobre os fármacos utilizados para o TDM, além da elevada prevalência dessa patologia e impactos significativos na vida dos pacientes, é de suma importância a busca por alternativas terapêuticas com maior eficácia e menor toxicidade, além do uso dos modelos animais como ferramenta para o estudo do TDM. Neste sentido, os compostos naturais surgem como alternativas terapêuticas preventivas ou no possível auxílio durante o tratamento farmacológico tradicional que possam otimizar a eficácia clínica. O AT, por suas importantes propriedades biológicas já descritas na literatura, é uma molécula a ser analisada a respeito do seu possível perfil tipo-antidepressivo e seus mecanismos de ação no TDM.

3. Objetivos

Objetivo geral: Avaliar o efeito preventivo do AT sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em modelo animal de depressão induzido por LPS em camundongos.

3.1 Objetivos específicos:

- Investigar o efeito tipo-antidepressivo do tratamento com AT em camundongos submetidos ao modelo de depressão através de parâmetros comportamentais (teste do nado forçado, teste do campo aberto, teste de suspensão da cauda e teste de borrifagem por sacarose);
- Avaliar o efeito antioxidante e neuroprotetor do AT frente aos marcadores de estresse oxidativo (níveis de espécies reativas de oxigênio, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, nitritos e sulfidrilas; atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de camundongos;
- Verificar o papel do AT frente a neuroinflamação através da análise dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de camundongos.

4. Revisão Bibliográfica

4.1 Transtorno Depressivo Maior (TDM)

O TDM, também conhecido como Depressão Maior (DM), é o mais prevalente dentre as doenças psiquiátricas e uma das condições neuropsicológicas mais debilitantes, que resulta em problemas psicossociais e perdas econômicas, gerando um impacto negativo na sociedade (MAURYA et al., 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 264 milhões de pessoas ao redor do mundo são acometidas pela DM (OMS, 2020). A depressão é uma das principais preocupações de saúde pública com grande impacto global (JAYASEKARA et al., 2014), e parte desse impacto é devido a reduzida farmacoterapia disponível (CORP et al., 2014; MAURYA et al., 2016). Sabe-se que essa é uma condição multifatorial causada por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e psicológicos (MAURYA et al., 2016). Vários mecanismos parecem estar envolvidos na fisiopatologia dessa doença, como a deficiência de monoaminas, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), alterações no estado hormonal, aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo (MOYLAN et al., 2014; MAURYA et al., 2016; LINDQVIST et al., 2017).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) (*American Psychiatric Association*, 2013) ainda é o guia mais utilizado para caracterização do TDM e dos subtipos da depressão. Normalmente, para o indivíduo ser diagnosticado com depressão maior “típica”, pelos critérios do DSM, deve apresentar um conjunto de sintomas por pelo menos um período de duas semanas. Esses compreendem humor depressivo ou anedonia (ou seja, não sentem prazer ao realizar eventos ou estímulos que anteriormente foram recompensadores), juntamente com quatro sintomas adicionais de uma lista prescrita. Os sintomas adicionais são compostos de perda significativa de peso ou ganho de peso, insônia ou hipersonia quase todos os dias, agitação psicomotora ou retardo, fadiga ou perda de energia, sentimentos de inutilidade ou excessivo, culpa inadequada, habilidades cognitivas diminuídas (ANISMAN et al., 2018).

Embora a característica mais típica dos estados depressivos seja a proeminência dos sentimentos de tristeza ou vazio, nem todos os pacientes relatam a sensação subjetiva de tristeza. Entretanto, muitos alegam a perda da capacidade de experimentar prazer nas atividades em geral. A sintomatologia desse transtorno pode

ser dividida em sintomas psíquicos (sensação de tristeza, autodesvalorização e sentimentos de culpa), sintomas fisiológicos (alterações do sono, alterações do apetite e redução do interesse sexual) e evidências comportamentais (retraimento social, crises de choro e comportamento suicida) (DEL PORTO, 1999).

Diversos estudos de imagem mostram alterações na estrutura e funcionamento de importantes regiões cerebrais em pessoas acometidas pelo TDM. A avaliação de indivíduos saudáveis, em comparação aos indivíduos depressivos, permitiu relatar que esses apresentam menor volume hipocampal e níveis aumentados de mediadores pró-inflamatórios nessa estrutura cerebral. (FRODL et al., 2012). A inflamação observada nesses indivíduos foi associada à diminuição da conectividade em regiões cerebrais relacionadas à recompensa, como o estriado e o córtex pré-frontal ventromedial, que por sua vez se correlacionaram com o aumento da anedonia (FELGER et al., 2016). Alterações na estrutura e função das regiões do cérebro envolvidas na regulação da emoção, incluindo hipocampo, amígdala, córtex cingulado anterior, córtex orbitofrontal e estriado ventral podem ser induzidas pelos efeitos neurotóxicos da neuroinflamação, levando o cérebro a maior suscetibilidade à depressão (KIM & WON, 2017).

Atualmente, estima-se que cerca de 264 milhões de pessoas convivem com a depressão no mundo todo. A incidência dessa enfermidade aumentou 18,4% entre 2005 e 2015, refletindo o crescimento global da população, bem como o expressivo aumento nos casos dessa desordem. As taxas de prevalência variam de acordo com a idade, com um pico na idade adulta (cerca de 7,5% das mulheres entre 55 e 74 anos e cerca de 5,5% entre homens). A depressão também ocorre em crianças e adolescentes com idade inferior a 15 anos, porém em um nível inferior em comparação a pessoas com idade mais avançada (OMS, 2020).

Estima-se que até 30% dos pacientes com TDM não apresentam melhora durante o tratamento com antidepressivos ou respondam parcialmente, apresentando comprometimento funcional, baixa qualidade de vida, ideação suicida, comportamento autolesivo e alta taxa de recaída. Esse fato demonstra a problemática relacionada a farmacoterapia atualmente disponível para a depressão, e a necessidade de busca por novas alternativas terapêuticas (AL-HARBI et al., 2012; MISIAK et al., 2018).

O ônus financeiro da assistência médica tornou-se enorme entre os países, sendo o custo dos cuidados médicos relacionados a doenças mentais um dos mais altos. Isso ocorre não apenas porque a depressão reaparece com frequência, mas

também porque indivíduos deprimidos utilizam instalações médicas (para problemas não relacionados à saúde mental) com mais frequência do que indivíduos não-deprimidos (ANISMAN et al., 2018).

4.2 Tratamentos disponíveis para o TDM

Já se passaram mais de 60 anos desde que os primeiros fármacos antidepressivos monoaminérgicos surgiram, e eles continuam sendo a primeira linha de tratamento utilizada. Entretanto, a heterogeneidade da doença dificulta o estabelecimento de tratamentos eficientes, visto que muitos pacientes não são responsivos a essas terapias (CESKOVA, 2016). A maioria dos antidepressivos tem eficácia similar, e a escolha do medicamento deve ser baseada em vários fatores, incluindo a eficácia dos medicamentos em sintomas específicos, a interação com outros fármacos, a segurança na superdosagem e efeitos adversos (CLEARE & DUNCKO, 2016).

A fase inicial do tratamento deve incluir revisões a cada 1 ou 2 semanas para avaliar a resposta, adesão ao tratamento, efeitos adversos e risco de suicídio. Efeitos adversos leves ou transitórios podem ser gerenciados com auxílio psicológico; já os efeitos mais graves ou persistentes podem exigir uma redução de dose ou mudança de fármaco (CLEARE & DUNCKO, 2016). Apesar dos avanços na farmacoterapia, 10-15% dos pacientes não respondem ao primeiro tratamento e outros 30-40% têm remissão parcial, sendo o restante responsivo aos fármacos (RUSH et al., 2006; CLEARE & DUNCKO, 2016). O tratamento para a remissão da depressão é fundamental para assegurar a qualidade de vida do paciente e prevenir recaídas (CLEARE & DUNCKO, 2016).

As classes de fármacos utilizadas atualmente são (Tabela 1): (I) Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS); (II) Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN); (III) Antidepressivos tricíclicos; (IV) Inibidores da monoamina oxidase (IMAOs); (V) Inibidores da recaptação de dopamina e noradrenalina (IRDN) (KUPFER et al., 2012; MALHI & MANN, 2018).

Classes	Mecanismo de ação	Exemplos
(I) Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS)	Inibição da recaptação pré-sináptica da serotonina através do bloqueio dos transportadores, ocasionando o aumento da concentração de 5-HT na fenda sináptica	Citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina
(II) Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN)	Inibição da recaptação da serotonina e noradrenalina por bloqueio de transportadores	Desvenlafaxina, duloxetina, venlafaxina
(III) Antidepressivos tricíclicos	Inibição não-seletiva da recaptação de monoaminas, incluindo serotonina, dopamina e noradrenalina	Imipramina, doxepina, protriptilina, trimipramina
(IV) Inibidores da monoamina oxidase (IMAOs)	Inibição das enzimas MAO-A e MAO-B envolvidas no metabolismo de monoaminas	Moclobemida, isocarboxazida, fenilzina, tranilcipromina, selegilina
(V) Inibidores da recaptação de dopamina e noradrenalina (IRDN)	Inibição da recaptação de noradrenalina e dopamina	Bupropiona

Tabela 1: Classes de fármacos utilizados para o tratamento do TDM. Adaptado de: KUPFER et al., 2012; MALHI & MANN, 2018.

4.3 Hipóteses do TDM

Apesar das contínuas pesquisas no campo da neuropsiquiatria, os mecanismos precisos da patofisiologia da depressão ainda não são bem esclarecidos. Algumas hipóteses descritas na literatura apontam diferentes fatores relacionados com essa doença; dentre essas hipóteses destacam-se a do estresse oxidativo, monoaminérgica, da desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e inflamatória (JESULOLA et al., 2018).

4.3.1 Hipótese do estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e a capacidade do organismo de neutralização através de mecanismos antioxidantes (BARBOSA et al., 2010). As células aeróbias produzem

espécies reativas como subproduto de seus processos metabólicos e, quando em excesso, essas espécies podem oxidar biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBOSA et al., 2010; MAURYA et al., 2016). A vida aeróbica e o metabolismo energético são indissociáveis da produção de moléculas oxidantes. No entanto, as espécies reativas de oxigênio (ERO) não são apenas uma consequência indesejável da atividade metabólica, produzidas como um produto secundário dos complexos respiratórios mitocondriais; algumas dessas moléculas têm importantes funções de sinalização celulares (KIM et al., 2019).

A fisiologia celular exige equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes (RIBEIRO et al., 2005). Devido a tal condição, as defesas antioxidantes são responsáveis por inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicalares (BARBOSA et al., 2010). O antioxidante pode ser determinado de *scavenger*, quando age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou *quencher*, quando consegue neutralizar completamente o radical (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (BARBOSA et al., 2010). A SOD é responsável por dismutar dois ânions radicais superóxidos em uma molécula de peróxido de hidrogênio. A CAT catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, especialmente quando esse produto encontra-se em altas concentrações (BAUD et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007). A GPx, juntamente com a glutathione reduzida (GSH), glutathione redutase (GR) e NADPH, constituem um eficiente sistema na proteção contra o peróxido de hidrogênio, sendo capaz de manter níveis baixíssimos desse produto (RIBEIRO et al., 2005). Já o sistema de defesa não-enzimático inclui vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonoides, tióis proteicos e não-proteicos e micronutrientes (MAURYA et al., 2016).

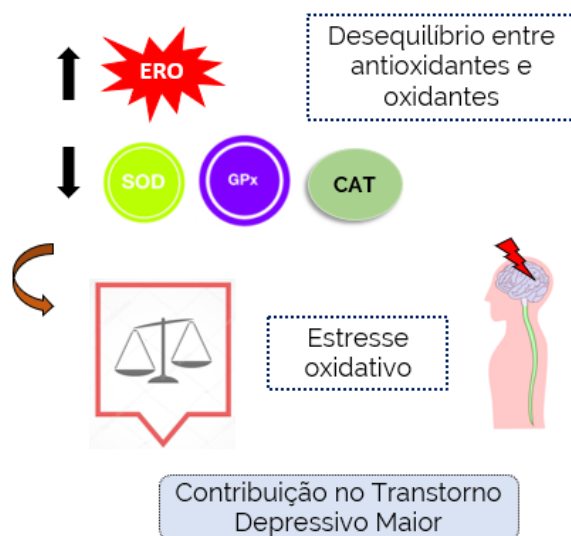


Figura 1: Esquema demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo no TDM.

A desregulação na sinalização redox é um mecanismo comum em diversas doenças, sendo crucial na fisiopatologia da depressão. Esse processo pode levar a danos celulares graves, causando disfunção fisiológica e morte celular, e está representado na figura 1 (MOYLAN et al., 2014; MAURYA et al., 2016). As espécies reativas como o peroxinitrito, superóxidos, peróxidos e óxido nítrico (NO) são produtos de processos fisiológicos normais. Entretanto, quando em excesso, são potencialmente tóxicos e associados a patogênese de doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC). Além do envolvimento em patologias, estudos demonstram que os níveis de ERO estão elevados com o avanço da idade em diversos órgãos, incluindo o cérebro (HSIEH & YANG, 2013; MOYLAN et al., 2014). Sabe-se que o cérebro é um órgão vulnerável ao dano oxidativo, devido a sua alta taxa metabólica, alto consumo de oxigênio e níveis reduzidos de defesas antioxidantes (MAES et al., 2011).

A mitocôndria é a organela que mais atua na geração de espécies reativas, contribuindo assim para o processo de estresse oxidativo. Sabe-se que é responsável por diversas funções celulares, incluindo o metabolismo energético, homeostase de cálcio e apoptose (CULMSEE et al., 2019). Durante a produção de adenosina trifosfato (ATP), através da transferência de elétrons pelos complexos I-V, pode ocorrer escape desses, o que resulta na redução parcial do oxigênio. Desse modo, ocorre a formação do radical superóxido. A disfunção mitocondrial na depressão, incluindo atividade reduzida da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e suas enzimas, diminuição da produção de ATP, alterações nas estruturas mitocondriais no cérebro e diminuição da

expressão de transcritos de ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial foram relatados na literatura (MOYLAN et al., 2014). Essas alterações estão demonstradas na figura 2.

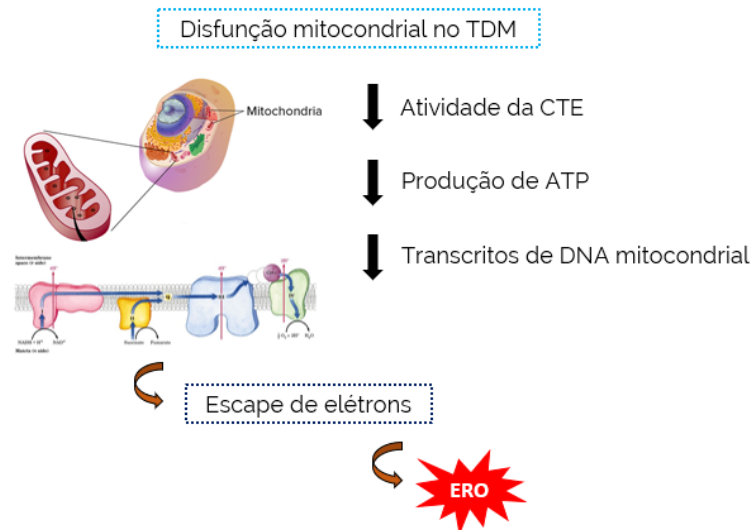


Figura 2: Esquema demonstrando os processos mitocondriais alterados no TDM.

Diversos estudos apontam que pacientes depressivos possuem menores concentrações plasmáticas de vitamina E, vitamina C (MOYLAN et al., 2014), GPx e SOD no soro (MAES et al., 2011), além de níveis aumentados de malondialdeído (MDA), composto relacionado com a peroxidação lipídica (KHANZODE et al., 2003) e nitrotirosina, composto relacionado com danos proteicos (MAES et al., 2011). Além disso, o processo de desregulação redox leva ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), consequentemente diminuindo a disponibilidade de serotonina (MILLER et al., 2009), ocasionando a indução de vias apoptóticas (MAES et al., 2011).

4.3.2 Hipótese monoaminérgica

A observação, em meados do século 20, de que o fármaco anti-hipertensivo reserpina poderia desencadear depressão causou interesse no papel potencial dos neurotransmissores monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina e dopamina) na patogênese desse transtorno. Posteriormente, a descoberta dos antidepressivos tricíclicos e dos IMAOs apoiaram a teoria das monoaminas, visto que esses aumentaram a neurotransmissão dessas moléculas e foram capazes de melhorar o quadro clínico de pacientes (MALHI & MANN, 2018). Desde então, as terapias

farmacológicas focam na modulação dos neurotransmissores monoaminérgicos para o tratamento da depressão (GOLDBERG et al., 2014).

O cérebro contém um grande número de neurônios noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. A noradrenalina (NE) é responsável por modular o processamento da memória, regular o comportamento e a atenção. A serotonina (5-HT), por sua vez, inerva todas as áreas do cérebro e está relacionada com o apetite, memória e cognição; já a dopamina (DA) modula as funções de recompensa e motivação, memória operacional e atenção (JESULOLA et al., 2018).

A hipótese monoaminérgica afirma que os sintomas depressivos ocorrem devido à redução na concentração dos neurotransmissores monoaminérgicos 5-HT, NA e DA na fenda sináptica (ELHWUEGI, 2004). Entretanto, essa teoria possui algumas limitações, como o fato de não explicar a notável variabilidade na apresentação clínica dos episódios depressivos, o porquê de alguns pacientes não responderem a determinados antidepressivos (MALHI & MANN, 2018), e o fato de que as mudanças nos níveis de monoaminas ocorrem poucas horas após a administração dos antidepressivos, mas a resposta terapêutica requer a administração contínua desses medicamentos por semanas (ELHWUEGI, 2004).

4.3.3 Hipótese da desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)

A depressão possui uma relação estreita com anormalidades no sistema de resposta ao estresse. Esse sistema é um mecanismo complexo amplamente dependente da regulação de feedback. Baseia-se em dois elementos principais - a resposta autonômica ao estresse, que exerce efeitos imediatos quando o organismo enfrenta estressores fisiológicos ou psicológicos; e o impacto no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (JURUENA et al., 2018).

O eixo HPA é um sistema regulatório que integra as funções neuronal e endócrina, como demonstrado na figura 3 (WATSON & MACKIN, 2009). A ativação desse eixo inicia-se com estímulos estressantes internos ou externos. Desse modo, inicia-se a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, que por sua vez estimula a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise; por fim, estimulando a secreção dos glicocorticoides (cortisol) pela glândula adrenal. Os glicocorticoides, em seguida, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição do feedback de CRH do hipotálamo e diretamente na secreção de ACTH da hipófise (PARIANTE & LIGHTMAN, 2008).

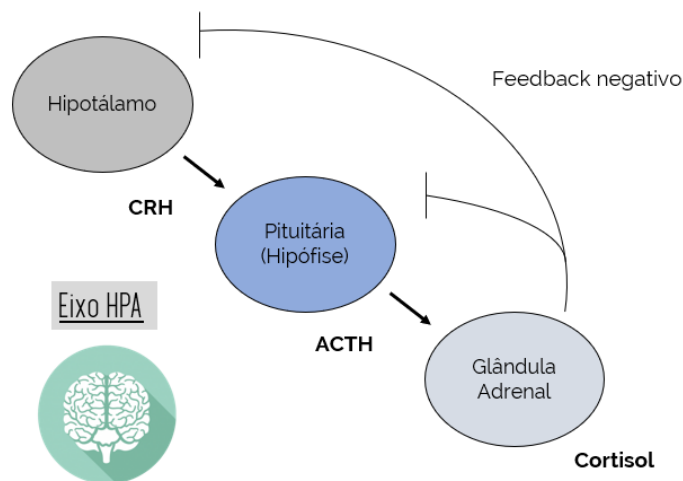


Figura 3: Esquema demonstrando o funcionamento do eixo HPA.

A ativação do eixo HPA não regula somente funções periféricas do corpo, como o metabolismo e a imunidade, mas também possui efeitos no cérebro. Sabe-se que os glicocorticoides regulam a sobrevivência neuronal, neurogênese e a aquisição de novas memórias (JURUENA et al., 2018). O cortisol, sendo o produto final do eixo, possui uma ampla gama de efeitos centrais e periféricos, que incluem a coordenação de eventos circadianos, como o ciclo sono/vigília e a ingestão de alimentos; respostas em adaptação ao estresse, e também a promoção de processos de aprendizagem e memória (WATSON & MACKIN, 2009).

A hiperatividade do eixo em indivíduos depressivos tem sido documentada desde o final da década de 1950 (BOARD et al., 1957; MCKAY & ZAKZANIS, 2010). Algumas dessas alterações incluem hipersecreção de CRF, feedback negativo prejudicado, glândulas adrenais aumentadas, hipercortisolemia e sinalização prejudicada do receptor de corticosteroides (DEAN & KESHAVAN, 2017; JESULOLA

et al., 2018). Alguns sinais e sintomas depressivos, como excesso de culpa, diminuição do apetite, perda de peso, diminuição do comportamento sexual, distúrbios do sono, atividade psicomotora alterada e resposta hiperativa a estressores psicológicos têm sido relacionados à disfunção do eixo HPA (JESULOLA et al., 2018).

4.3.4 Hipótese inflamatória

A inflamação do SNC desempenha um papel significativo na patogênese da DM devido a relatos do aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com neurodegeneração e sintomas de depressão como anedonia, humor deprimido e letargia (MILLER et al., 2009; YOUNG et al., 2014). Embora não esteja claro como as citocinas podem iniciar ou influenciar a patogênese dos transtornos depressivos, uma hipótese postula que as citocinas pró-inflamatórias estimulam a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) nas células gliais a converter o triptofano em quinurenina (YOUNG et al., 2014). Essa, por sua vez, pode ser transformada em ácido quinurênico por enzimas quinurenina amino-transferases, ou em 3-hidroxiquinurenina pela quinurenina monoxigenase (KIM et al., 2016).

A quinurenina pode ser degradada em diferentes metabólitos, dependendo do tipo celular. Podemos citar microglia e astrócitos como as principais células que metabolizam essa substância. A quinurenina monoxigenase é expressa em microglia, e as enzimas quinurenina amino-transferases são expressas em astrócitos. A 3-hidroxiquinurenina, após algumas conversões, pode gerar o ácido quinolínico, um forte agonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Desse modo, esse agonista estimula a liberação de glutamato, inibe a recaptação de glutamato e reduz a ação da glutamina sintase, levando ao aumento desse neurotransmissor no meio extracelular e dos neurônios excitatórios que causam excitotoxicidade e apoptose (KIM et al., 2016). A ativação imune mediada pela via da quinurenina causa um aumento de metabólitos neurotóxicos e diminui os metabólitos neuroprotetores no cérebro, sugerindo a participação desse mecanismo na etiologia da depressão (KIM et al., 2016).

Citocinas são proteínas (15-25 kDa), mais especificamente mediadores inflamatórios químicos secretados por células linfóides, com a finalidade de regular as respostas imunes, reparar tecidos danificados e restaurar a homeostase. Funcionam como reguladores de todas as outras células imunes (por exemplo, linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e células natural killer) envolvidas no processo de inflamação no corpo. As citocinas incluem os interferons (INF), interleucinas (IL), fatores estimulantes de colônias e outros, como por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF- α) e proteína C-reativa (PCR) (JESULOLA et al., 2018). Indivíduos depressivos mostraram níveis plasmáticos elevados de biomarcadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1, IL-6, TNF- α e PCR em comparação aos controles (YOUNG et al., 2014). Os mecanismos inflamatórios relacionados a DM estão representados na figura 4.

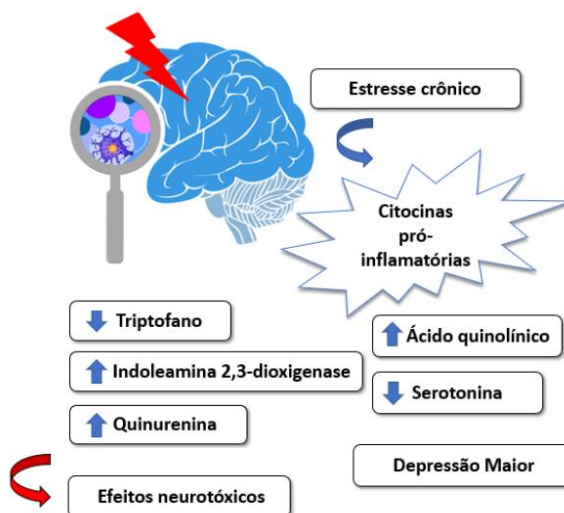


Figura 4: Esquema demonstrando alguns mecanismos inflamatórios envolvidos no TDM.

Estudos relataram que as citocinas pró-inflamatórias podem influenciar a síntese, liberação e recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos e o glutamato, ambos envolvidos na etiologia da DM (MILLER et al., 2009; LOTRICH, 2015). O tratamento realizado com IFN- α em ratos levou a diminuição da disponibilidade de 5-HT (SATO et al., 2006). Da mesma forma, a administração desse mediador inflamatório alterou os níveis de dopamina (LOTRICH, 2015). A neurotransmissão glutamatérgica também é modulada pela inflamação, ocorrendo a expressão aumentada da IDO, desviando o triptofano para a formação de quinurenina e subsequentes metabólitos, como o ácido quinurênico (KA) e o ácido quinolínico, e assim, influenciando na transmissão do glutamato (LOTRICH, 2015).

Alguns pacientes depressivos demonstraram características referentes a uma resposta imunológica ativada, incluindo aumento de mediadores pró-inflamatórios no sangue e no líquido, e aumento nas concentrações sanguíneas de proteínas de fase aguda, quimiocinas e moléculas de adesão. Dependendo da extensão do estímulo inflamatório, a resposta pode se tornar sistêmica, levando a liberação de citocinas na circulação periférica, podendo chegar ao cérebro (MILLER et al., 2009).

Diversas evidências sugerem que a inflamação central e periférica possuem um papel importante nos sintomas depressivos (ZHANG et al., 2016). As primeiras hipóteses que fornecem evidências para essa relação foram baseadas na chamada conceituação de “comportamento doentio”, que retrata sentimentos subjetivos durante estados de infecção (DANTZER, 2009; MISIAK et al., 2018). De fato, tem sido observado que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias durante períodos de infecção estão relacionados a sintomas como febre, mal estar, dor, fadiga, humor deprimido e baixa concentração, lembrando fenótipos de depressão (VOLLMER-CONNA et al., 2004; MISIAK et al., 2018).

4.4 Envolvimento da neuroinflamação no TDM

A inflamação é um processo de defesa contra injúrias com a finalidade de restabelecer a integridade tecidual, tendo como propósito destruir e remover agentes externos de modo a beneficiar a homeostase do organismo (HSIEH e YANG, 2013). As características do processo neuroinflamatório incluem a presença de microglia reativa, com ou sem componentes do sistema imune adaptativo (linfócitos T e B), aumento da produção de citocinas, quimiocinas, anticorpos e outros mediadores inflamatórios (HOSTENBACH et al., 2014). A neuroinflamação ocorre no SNC, fisiologicamente, como mecanismo de defesa, mas também está presente em processos neuropatológicos (RANSOHOFF et al., 2016). Entretanto, quando prolongada, é potencialmente perigosa e pode causar danos celulares (RAMIREZ et al., 2017). Fatores como o processo de envelhecimento, demência, acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão, diabetes, tumores e infecções são alguns exemplos de condições que podem desencadear o processo neuroinflamatório (KEMPURAJ et al., 2016). Além disso, estudos sugerem que a inflamação também possui papel relevante em desordens neuropsiquiátricas, como a DM (THURGUR & PINTEAUX, 2018).

A barreira cérebro-sangue é uma proteção anatômica essencial para a manutenção da homeostase do SNC (SERLIN et al., 2015). Trata-se de uma estrutura

especializada que separa o parênquima cerebral do sangue periférico, composta por células endoteliais, pericitos e pés astrocitários (THURGUR & PINTEAUX, 2018). Por sua presença, esse local era considerado um órgão imuno-privilegiado. Porém, atualmente sabe-se que existem regiões específicas que permitem a passagem de citocinas, como os órgãos circunventriculares e transportadores de citocinas (KIM et al., 2016; KIM & WON, 2017). Desse modo, as respostas inflamatórias periféricas podem adentrar o SNC (KIM & WON, 2017).

As células da microglia são células imunes residentes do SNC, as quais possuem função fagocítica, correspondendo a cerca de 12 a 16% da população total de células nesse local (THURGUR & PINTEAUX, 2018). Essas são capazes de detectar alterações na homeostase, combinando uma ação defensiva com funções neuroprotetoras. Em condições fisiológicas, a microglia permanece no fenótipo em repouso e está envolvida em atividades neurotróficas como sinaptogênese, neurogênese e ativação de fatores neurotróficos por meio da ativação de citocinas pró-inflamatórias (KIM et al., 2016). No entanto, quando o cérebro é lesionado e a homeostase do microambiente é perturbada, as células da microglia modificam sua morfologia (KIM et al., 2016), proliferam e migram para os locais afetados, modificando a expressão de enzimas e receptores e liberando citocinas pró-inflamatórias e ERO, como representado na figura 5 (RAMIREZ et al., 2017; KIM & WON, 2017). Sob condições fisiológicas, o estado quiescente da microglia é mantido por diversos imunomoduladores. Porém, em determinadas situações, os fenótipos M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) podem ser ativados (WANG et al., 2015).

Em resposta a inflamação periférica, as células gliais podem produzir quimiocinas que atraem monócitos para o cérebro, e esses, por sua vez, podem produzir ainda mais mediadores pró-inflamatórios (KIM & WON, 2017). Além disso, a microglia ativada pode produzir quinurenina-3 monoxigenase e ácido quinolínico. Esses metabólitos da quinurenina são considerados neurotóxicos e podem contribuir com o estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica (WANG et al., 2018).

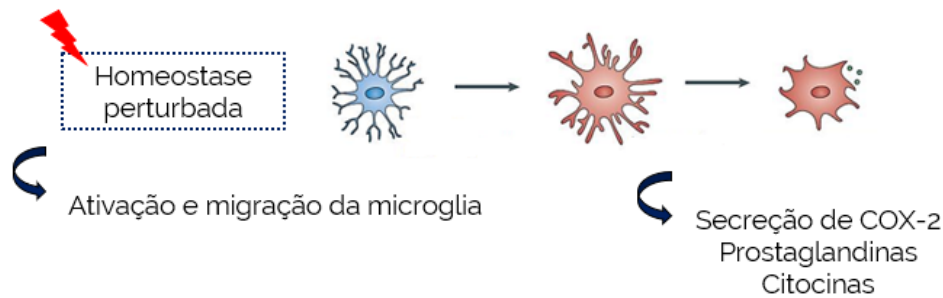


Figura 5: Ilustração demonstrando as modificações ocasionadas na microglia decorrente de distúrbios na homeostase tecidual.

Os astrócitos correspondem a cerca de 40% da população celular do SNC, e são responsáveis por manter a homeostase desse local (HSIEH & YANG, 2013). Essas células possuem diversos papéis importantes, dentre eles a participação na transmissão sináptica através da liberação de moléculas, incluindo ATP e glutamato; funções no metabolismo, como o armazenamento de glicogênio; migração de neurônios durante o desenvolvimento cerebral e participação em respostas imunológicas (SOFRONIEW & VINTERS, 2010; HSIEH & YANG, 2013). Em particular, os astrócitos detectam e amplificam os sinais inflamatórios e os efeitos neurotóxicos iniciados pela microglia (WANG et al., 2018). Os eventos envolvidos na neuroinflamação estão representados na figura 6.

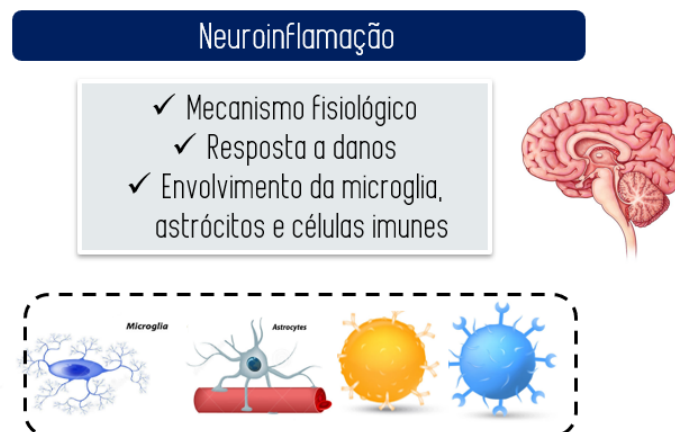


Figura 6: Eventos envolvidos no processo neuroinflamatório.

Em contraste com as doenças neurodegenerativas que são comumente associadas à proliferação astrogliar, a neuroinflamação no contexto dos distúrbios psiquiátricos mostra uma redução ou inalteração na densidade de astrócitos em áreas cerebrais relevantes. Estudos *post-mortem* de pacientes depressivos revelam a perda de astrócitos em áreas cerebrais, incluindo o córtex pré-frontal, a amígdala e a substância branca (HOSTENBACH et al., 2014).

Um estudo prévio de Wang e colaboradores (2018) demonstrou que a inibição de astrócitos em um modelo animal de depressão induzido por LPS preveniu alterações no teste de suspensão da cauda (TSC) e teste do nado forçado (TNF). Através da utilização do fluorocitrato, um conhecido inativador de astrócitos, foi observado que a inibição dessas células atenuou a neuroinflamação e o comportamento tipo-depressivo dos camundongos. Além disso, os resultados demonstraram que houve diminuição dos níveis de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e aumento dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex e hipocampo dos animais.

4.5 Modelos animais para o TDM

Grande parte do entendimento atual sobre a fisiopatologia da depressão veio da utilização de modelos animais, os quais são uma importante ferramenta para o estudo de mecanismos neurobiológicos do TDM e teste de potenciais novos fármacos antidepressivos (KRISHNAN & NESTLER, 2011). No entanto, devido às características únicas e complexas dessa doença em humanos, não existe um único modelo capaz de mimetizar todas as suas características. Em vez disso, diferentes modelos podem ser utilizados, nos quais o comportamento depressivo é causado por indutores distintos para compreender mais sobre os mecanismos subjacentes à essa condição psiquiátrica (SÖDERLUND & LINDSKOG, 2018). Dentre os indutores que podem causar o comportamento tipo-depressivo, estão a exposição aguda ou crônica ao estresse, administração exógena de glicocorticoides, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , por exemplo), LPS, além de modelos geneticamente modificados (KRISHNAN & NESTLER, 2011; WANG et al., 2017).

4.5.1 Lipopolissacarídeo

O LPS é uma endotoxina da parede celular de bactérias gram-negativas capaz de ativar a microglia e induzir neuroinflamação (LAWSON et al., 2013, LEE et al., 2008; WICKENS et al., 2018). Sua estrutura consiste na junção de lipídio e polissacarídeo por ligação covalente, e está representada na figura 7 (XU et al., 2014). Além disso, é um componente capaz de ativar fortes respostas imunes e está envolvido na patogênese da septicemia (CHEN et al., 2015; ZHANG et al., 2017). É o ligante mais importante reconhecido pelo receptor do tipo Toll-4 (TLR-4), uma proteína

transmembrana presente nas células de defesa do hospedeiro capaz de reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (WALTER et al., 2007).

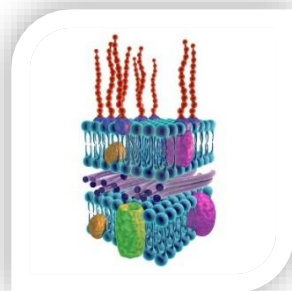


Figura 7: Representação da estrutura do lipopolissacarídeo (LPS).

O aumento das citocinas periféricas induzido pelo LPS é capaz de estimular a síntese de citocinas no SNC através da passagem dessas proteínas pela barreira cérebro-sangue caracterizando a neuroinflamação derivada da inflamação sistêmica (QIN et al., 2007). A ativação do receptor do tipo Toll-4 pelo LPS aumenta a transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição pró-inflamatório que induz a produção rápida e exacerbada de citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (VERSTREPEN et al., 2008; CHEN et al., 2015; BOSSHART e HEINZELMANN, 2007). Essas citocinas produzidas acabam ativando neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, as quais produzem ERO e fatores inflamatórios, levando a danos teciduais (CHEN et al., 2015).

A ativação aguda do sistema imune inato periférico em animais através da administração do LPS induz comportamento tipo-depressivo, avaliado pelo aumento da imobilidade no TNF e TSC, diminuição na atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA), anedonia, diminuição do consumo da solução com sacarose e uma supressão do comportamento sexual, que pode ser atenuada pela administração de antidepressivos (O'CONNOR et al., 2009). Os animais tratados perdem peso, comem e bebem menos, e diminuem sua atividade motora por várias horas a dias, dependendo da natureza do agente inflamatório e da dose. Esses comportamentos correspondem a elevações nas citocinas pró-inflamatórias na periferia e no cérebro (REMUS & DANTZER, 2016).

4.6 Ácido Tânico

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas, consistindo em formas hidrolisáveis e condensadas (LOPES et al., 1999). São conhecidos por seu papel na qualidade e segurança dos alimentos, uma vez que contribuem significativamente com o sabor e cor, por exemplo. Além disso, são fatores importantes na saúde a longo prazo, contribuindo para reduzir o risco de doenças crônicas (ARAPITSAS, 2012). Apesar da deficiência de polifenóis não estar associada a patologias específicas, sabe-se que a ingestão adequada desses compostos pode conferir benefícios à saúde, especialmente quando se trata de doenças crônicas (FRAGA et al., 2019).

Os fitoquímicos presentes em diversos vegetais tem ganhado atenção devido ao seu amplo espectro de ações, dentre elas a neuroprotetora e a capacidade de modular aspectos cognitivos. Podemos citar a epigallocatequina galato (EGCG) e a curcumina, as quais têm sido associadas a maior função cognitiva e efeitos protetores contra várias doenças do SNC. À medida que as evidências demonstram as características benéficas dos polifenóis, cresce a possibilidade de regulação da dieta como uma alternativa terapêutica para manutenção e proteção cognitiva (GOMEZ-PINILLA & NGUYEN, 2012).

O ácido tânico (AT), que faz parte dos taninos hidrolisáveis, teve sua estrutura primeiramente descrita por Adolph Strecker em meados do século XVIII (ARAPITSAS, 2012). Consiste em uma molécula de glicose na parte central, além de cinco cadeias de ácido gálico ligadas por esterificação, e está representada na figura 8 (BRANDÃO et al., 2008; MATTOS, 2009). Encontra-se presente em diversos alimentos tais como uvas, lentilhas, chocolate, chá verde e vinho tinto (KUO et al., 1992; LOPES et al., 1999). Os taninos são substâncias fenólicas que apresentam diversas atividades farmacológicas, dentre elas destacam-se atividades antimutagênicas, anticarcinogênicas e antioxidante (BRANDÃO et al., 2008; MATTOS, 2009).

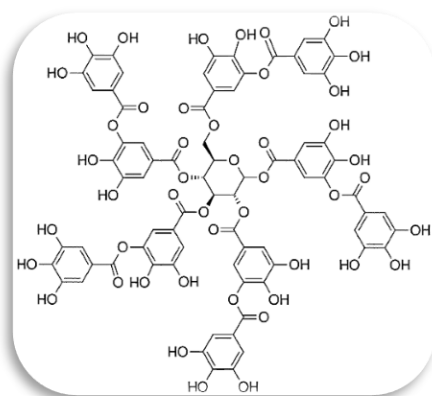


Figura 8: Representação da estrutura do ácido tânico (AT).

O mecanismo de ação antioxidante de polifenóis tem sido atribuído a capacidade de sequestrar radicais livres. O AT também atua desta forma; além disso, possui a capacidade quelante, sendo capaz de complexar-se com íons ferro (Fe), impedindo a participação dessas moléculas na reação de Fenton e de reações com o peróxido de hidrogênio. Assim, diminui-se a formação de radicais livres (LOPES et al., 1999). É importante destacar que o Fe é o metal mais abundante no organismo, sendo um componente essencial de diversas enzimas. Esse micronutriente é regulado por sistema específico, a fim de evitar toxicidade. O Fe em excesso relaciona-se com o surgimento do estresse oxidativo; esse processo, por sua vez, pode levar a alterações na homeostase desse metal (PUNTARULO, 2005).

O AT possui diversas ações relatadas na literatura. Dentre elas, a atividade antimutagênica (CHEN & CHUNG, 2000), anticarcinogênica (DAS et al., 1989; CHUNG et al., 1998; BONA et al., 2019), anti-inflamatória (ZHANG et al., 2015; ZHANG et al., 2017) e antioxidante (ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA et al., 2015). Nesse contexto, Athar et al. (1989) demonstraram que camundongos alimentados com dieta suplementada com AT tiveram uma incidência significativamente menor de tumores de estômago e pulmonares em comparação com animais alimentados com dieta controle. Em trabalho realizado por Darvin et al. (2016), o AT modulou vias específicas e induziu apoptose em linhagens de carcinoma de mama (DARVIN et al., 2016). Ainda, o AT foi capaz de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 via bloqueio da sinalização do NF-κB em cultivo de macrófagos, diminuindo a secreção de IL-1β. Além disso, os autores observaram que baixas concentrações do composto suprimiram a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF-α induzida por LPS. Assim, demonstrou-se que o AT pode ser uma alternativa para doenças relacionadas à ativação do NLRP3,

como desordens inflamatórias, metabólicas (SONG et al., 2018) e depressão, visto que nessa patologia o NLRP3 é ativado em monócitos periféricos de pacientes (KAUFMANN et al., 2017).

No modelo *in vivo* de demência esporádica do tipo Alzheimer induzida por estreptozotocina (STZ), o AT demonstrou ser uma promissora alternativa, visto que preveniu a diminuição de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e o aumento de TBARS no córtex cerebral e hipocampo dos animais. Além disso, foi capaz de modular a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e da bomba de sódio-potássio ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase) e prevenir o déficit de memória avaliado no teste de reconhecimento de objetos (GERZSON et al., 2019).

A respeito da absorção, metabolismo e toxicologia desse composto, estudos verificaram que o AT é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal de ratos, indo para a corrente sanguínea e sendo rapidamente excretado, com baixa toxicidade oral aguda, subcrônica e crônica (PHIWCHA et al., 2018).

5. Manuscrito

Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid on lipopolysaccharide-induced depressive and inflammatory changes in mice

Karina Pereira Luduvico, Luiza Spohr, Mayara Sandrielly Pereira Soares, Fernanda Cardoso Teixeira, Alana Seixas de Farias, Natália Pontes Bona, Nathalia Stark Pedra, Anelize de Oliveira Campello Felix, Roselia Maria Spanevello, Francieli Moro Stefanello

Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid on lipopolysaccharide-induced depressive and inflammatory changes in mice

Karina Pereira Luduvico^{1*}, Luiza Spohr², Mayara Sandrielly Pereira Soares²,
Fernanda Cardoso Teixeira², Alana Seixas de Farias¹, Natália Pontes Bona¹,
Nathalia Stark Pedra², Anelize de Oliveira Campello Felix³, Roselia Maria
Spanevello², Francieli Moro Stefanello^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

³Biotério Central, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

*Address reprint requests to: Karina Pereira Luduvico and Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil, CEP: 96010-900, Phone: 55 53 32757355, Fax: 55 53 32757354

e-mail: karina_luduvico@outlook.com; fmstefanello@gmail.com

Abstract

Depressive-like behavior is caused by LPS administration and by an increase in inflammatory mediators. Tannic acid (TA) is a polyphenol with previously described antioxidant and neuroprotective properties. The aim of this study was to evaluate the effects of TA on lipopolysaccharide (LPS)-induced depressive-like behavior, as well as oxidative stress parameters and TNF- α levels in the brains of mice. Animals were pretreated once daily, with TA (30 or 60 mg/kg), fluoxetine (20 mg/kg) or vehicle for 7 days. On the 7th day, the animals received a single injection of LPS (830 μ g/kg). After 24 h, open field, forced swimming, tail suspension, and splash tests were conducted. The endotoxin induced depressive-like behavior in these mice and this was attenuated by TA. In the cerebral cortex, hippocampus, and striatum, LPS increased lipid peroxidation and reactive oxygen species production, and this was also prevented by TA administration. TA treatment also prevented a decrease in catalase activity within the striatum. Further, LPS administration caused increased levels of TNF- α in all brain structures, and this was prevented in the cortex by TA treatment. In conclusion, TA shows many neuroprotective properties, with demonstrated antioxidant, anti-inflammatory and antidepressant effects in this animal model of acute depressive-like behavior. Therefore, this compound could provide an alternative therapeutic approach for the treatment of MDD.

Keywords: Natural product; Redox status; Neuroinflammation; Depression; Mice

1. Introduction

Major Depressive Disorder (MDD) is a disease of high global prevalence, considered to be a debilitating and multifactorial disorder that results in economic and social burdens [1]. Depression is characterized by feelings of guilt, change in mood and cognitive deficits [2], as well as physical changes such as weight loss and disturbed sleep [3]. Conventional antidepressant drugs, with a mechanism based on increasing the synaptic concentration of monoamines, are still considered the first line therapy. However, these compounds have many side effects and potential drug interactions [4, 5]; therefore, it is necessary to search for new compounds with greater efficacy and tolerability.

Accumulating evidence demonstrates a relationship between oxidative stress and the pathophysiology of MDD. In excess, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), can lead to cell damage [6]. These molecules come mainly from mitochondrial metabolic processes, and can cause serious cellular injury in the brain [7]. These species contribute to both physiological and pathological processes, and are important in the mechanism of several pathologies, since they affect redox status and repair mechanisms in the cell [8, 9]. Studies have revealed that increased levels of ROS can lead to the hyperactivation of inflammatory responses, since they function as second messengers of the immune system. ROS generation is also stimulated by Toll-like receptor (TLR) ligands through inflammatory mediators [8].

Neuroinflammation is a pathological condition that is associated with various degenerative and neuropsychiatric diseases, including MDD. This mechanism contributes to symptomatology and cognitive impairment. A previous study has shown an increase in proinflammatory cytokines in depressive patients, including tumor necrosis factor alpha (TNF- α) [10]. TNF- α is produced by macrophages and is known to induce apoptosis, disorders in synaptic plasticity and depressive behaviors [10, 11].

Phenolic compounds are known to have a number of biological activities, including free radical scavenging, metal chelation, anti-inflammatory and antidepressant effects. These polyphenols have been studied in several pathologies, such as type 2 diabetes and neurodegenerative diseases [12]. These compounds promote neuroprotective actions, including the suppression of neuroinflammation, and the promotion of memory and cognitive functions [13]. Polyphenols can inhibit the release of cytokines, such as TNF- α , the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme, and ROS [13]. Zhu and colleagues [14] have also shown the antidepressant-like effect of

green tea polyphenols in mice. Tannic acid (TA) is a polyphenol with a significant chelating and antioxidant capacity, allowing it to attenuate free radical formation [15]. TA was previously reported to be effective in a streptozotocin-induced sporadic model of Alzheimer's dementia, demonstrating its potential in CNS disorders [16].

Based on this, we aimed to investigate the effect of chronic TA treatment in the lipopolysaccharide (LPS)-induced depressive changes in mice. A specific focus was placed on behavioral parameters, as well as markers of oxidative stress and inflammation in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum. The brain structures chosen in this study are involved in MDD physiopathology according to previous studies [17-19]. The hippocampus is the most commonly studied brain region in depression research. This structure contains high levels of glucocorticoid receptors, which makes it more susceptible to depression and provokes changes in hippocampal synaptic plasticity and volumetric area. Previous data have shown a loss of hippocampal neurons in depressive patients and this could be correlated to the symptoms of impaired memory and dysthymic mood [17]. The prefrontal cortex (PFC) has an important role in thinking and behavior in the brain, and this has also shown volume reduction in depressive disorders [18]. The striatum has relevant functions in voluntary motor control, cognition, reward, and social behavior [19].

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

TA and LPS (*E. coli* strain O55:B5) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). TNF- α immunoassay kit was purchased from BD Biosciences (BD Biosciences Laboratory Ltd., USA).

2.2 Animals

The protocols were approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, RS, Brazil (protocol number: CEEA 3781). Adult male Swiss mice (60 days, 30-45 g) were obtained from the Central Animal House of Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. The animals were kept at constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) under the light/dark cycle and free access to water and food. All animal experiments were carried out in accordance with the the

National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2.1 Experimental design

Mice were divided into five groups: I (vehicle/control), II (LPS 830 µg/kg), III (Fluoxetine 20 mg/kg + LPS), IV (TA 30 mg/kg + LPS) and V (TA 60 mg/kg + LPS). TA and fluoxetine were diluted with distilled water and administered orally once a day for seven days. On the 7th day of treatment, the animals received a single injection of LPS intraperitoneally (830 µg/kg) dissolved in sterile 0.9% NaCl solution or saline. Twenty four hours later, the depressive-like behavior parameters were evaluated (Figure 1). The TA, fluoxetine and LPS doses were based on previous studies (3, 19-21). After the behavioral tests, animals were euthanized with isoflurane. Brain was collected and the cerebral cortex, striatum, and hippocampus were dissected for biochemical analysis.

2.2.2 Body weight

The body weight was recorded on day 0 with 60 days of life and after 7 days, before LPS administration.

2.3 Behavioral parameters

2.3.1 Open Field Test (OFT)

The locomotor and exploratory activities of mice were evaluated through the OFT. Mice were individually placed into the apparatus (40 cm × 60 cm × 50 cm) and observed for 5 minutes [21]. The arena was cleaned with 40% ethanol after each trial.

2.3.2 Forced Swimming Test (FST)

For this test, mice were placed individually in a cylinder (height 25 cm, diameter 10 cm) filled to 10 cm with water at 25 ± 1 °C and animals were observed for 6 minutes, according to Porsolt et al [22]. The duration of immobility was recorded during the last 4 minutes. The immobility was defined when mice remained floating in the water without struggling.

2.3.3 Tail Suspension Test (TST)

Mice were suspended by the tail by an adhesive tape, placed 1 cm from the tip of the tail (50 cm above the floor). The total duration of immobility were observed for 6 minutes. Animals were considered immobile when they did not try to escape and hung passively [23].

2.3.4 Splash Test (ST)

For this behavioral analysis, 10% sucrose solution was squirted on the dorsal coat of mice. The ST lasted 5 minutes, and the animals were placed in a glass funnel for observation. The total grooming time and the latency time were evaluated. This parameter evaluates the self-care behavior [24].

2.4 Oxidative stress parameters

Brain structures were homogenized (1/10 w/v) using 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. The homogenates were centrifuged at 3500 *g* using a cold centrifuge at 4°C for 10 minutes. The supernatants were obtained and used in oxidative stress analysis.

2.4.1 Reactive oxygen species (ROS) assay

Quantification of ROS levels was determined by the oxidation of DCFH-DA to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, DCF fluorescence intensity was recorded at excitation of 525 and 488 nm 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium. ROS formation was expressed as $\mu\text{mol DCF/mg protein}$ [25].

2.4.2 Total sulfhydryl content assay

The total thiol content was determined by the reduction of DTNB by thiols and its oxidation (disulfide), forming a yellow derivative compound (TNB), whose absorption is measured in the spectrophotometer at 412 nm. The results were expressed as $\text{nmol TNB/mg of protein}$ [26].

2.4.3 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipid peroxidation was determined by estimating MDA formation. TBA and trichloroacetic acid were added to the supernatant for the reaction. TBARS levels were

quantified according to Esterbauer and Cheeseman [27] with absorbance at 535 nm and reported as nmol of TBARS/mg protein.

2.4.4 Nitrite assay

Nitrite reaction was made with sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), using the Griess reaction. The absorbance was measured at 540 nm. Results were expressed as μM nitrite/mg protein [28].

2.4.5 Catalase (CAT) activity

The protocol was performed according to Aebi [29]. This assay is based on the decomposition of the H_2O_2 at 240 nm. The CAT activity was reported as units/mg protein.

2.4.6 Superoxide dismutase (SOD) activity

This parameter is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation by SOD in the sample at 480 nm. The SOD activity is expressed as units/mg of protein [30].

2.4.7 Glutathione S-transferase (GST) activity

GST is an important enzyme used to detoxification of toxic compounds. The activity was expressed as μmol GSDNB/min/mg of protein [31].

2.4.8 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx is responsible for catalyze the reduction of hydrogen peroxide. Its activity was determined according to manufacturer instructions (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, United Kingdom) and was reported as units/mg of protein.

2.5 Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) assay

For this technique, cerebral structures were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS). Samples were centrifuged and supernatant was collected. Quantification of TNF- α was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) purchased from BD Biosciences Laboratory. The test was performed according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as pg/mg of protein.

2.6 Protein determination

For SOD, CAT, GPx and GST activity, and TBARS, total sulfhydryl content and TNF- α levels, protein was measured using the method described by Lowry et al. [32]. For ROS and nitrite levels, the protein was determined according to Bradford [33].

2.7 Statistical analysis

All statistical data were carried out using analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test in Graphpad Prism 5. $P \leq 0.05$ was considered to represent a significant difference in the analysis. All data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M.

3. Results

3.1 Effect of TA on behavior parameters

LPS administration induced depressive-like behaviors in mice which were assessed using a number of behavioral tests. Neither TA (30 and 60 mg/kg) nor fluoxetine treatment had significant effects on locomotion or exploratory (data not shown) behavior in the OFT ($F_{(4,35)} = 2.397$, $P > 0.05$; Fig 2A). Pretreatment with fluoxetine and TA (both doses) prevented the LPS-induced increase in immobility time during the FST ($F_{(4,31)} = 8.902$, $P < 0.001$, Fig 2B). Similarly, fluoxetine and TA (60 mg/kg) prevented the LPS-induced increase in immobility time during the TST ($F_{(4,24)} = 11.36$, $P < 0.001$; Fig 2C).

LPS decreased grooming time in the ST, showing a lack of self-care behavior, while fluoxetine and TA (30 & 60 mg/kg) pretreatment reduced this decrease ($F_{(4,32)} = 7.252$, $P < 0.001$; Fig 3A). In contrast, no significant changes were observed in grooming latency ($F_{(4,38)} = 2.456$, $P > 0.05$; Fig 3B).

3.2 Effect of TA on oxidative stress parameters in the hippocampus

In the hippocampus, LPS administration produced an increase in the levels of TBARS, and this could be prevented by pretreatment with TA (30 & 60 mg/kg) and fluoxetine ($F_{(4,23)} = 6.317$; $P < 0.01$; Fig 4A). Similarly, an LPS-induced increase ROS levels could be prevented by pretreatment with TA (30 & 60 mg/kg) and fluoxetine

($F_{(4,20)} = 11.88$; $P < 0.001$; Fig 4D). No significant changes were observed in nitrite levels ($F_{(4,22)} = 1.725$, $P > 0.05$; Fig 4G).

LPS administration reduced catalase (CAT) activity, however, neither TA (30 & 60 mg/kg) nor fluoxetine pretreatment restored enzyme activity ($F_{(4,23)} = 2.710$, $P < 0.05$; Fig 5A). In addition, no significant changes were observed in SOD activity ($F_{(4,17)} = 0.5377$; $P > 0.05$; Fig 5D), sulfhydryl levels ($F_{(4,23)} = 0.1450$, $P > 0.05$; Table 1), or glutathione peroxidase (GPx) activity ($F_{(4,17)} = 6.869$, $P > 0.05$; Table 1).

3.3 Effect of TA on oxidative stress parameters in the cerebral cortex

In the cortex, LPS administration produced an increase in TBARS levels ($F_{(4,27)} = 6.955$, $P < 0.001$; Fig 4B), and this was not prevented by any of the pretreatments. Additionally, an LPS-induced increase in ROS generation could be reduced by TA (30 & 60 mg/kg) and fluoxetine ($F_{(4,20)} = 13.36$, $P < 0.001$; Fig E). Similarly, LPS increased cortical nitrite levels, and this was prevented by both TA (30 & 60 mg/kg) and fluoxetine ($F_{(4,25)} = 8.074$, $P < 0.001$; Fig 4H).

LPS decreased CAT activity ($F_{(4,19)} = 3.659$, $P < 0.01$), however, neither TA (30 & 60mg/kg) nor fluoxetine could restore enzyme activity (Fig 5B). No statistical difference was observed in SOD activity ($F_{(4,28)} = 0.229$, $P > 0.05$; Fig 5E).

LPS administration decreased thiol content in the cerebral cortex ($F_{(4,23)} = 7.563$, $P < 0.001$; Table 1), and pretreatment did not alter this parameter. No differences were observed in GPx activity ($F_{(4,15)} = 2.723$, $P > 0.05$; Table 1).

3.4 Effect of TA on oxidative stress parameters in the striatum

In the striatum, LPS increased TBARS levels ($F_{(4,22)} = 9.447$, $P < 0.001$; Fig 4C) and ROS levels ($F_{(4,20)} = 19.15$, $P < 0.001$; Fig 4F), with both increases prevented TA (30 & 60 mg/kg) and fluoxetine. No differences were observed in nitrite levels ($F_{(4,21)} = 2.207$, $P > 0.05$; Fig 4I).

An LPS-induced decrease in striatal CAT activity could be prevented by both TA (30 & 60 mg/kg) and fluoxetine ($F_{(4,21)} = 12.09$, $P < 0.001$; Fig 5C). No differences in SOD activity were observed ($F_{(4,26)} = 2.051$, $P > 0.05$; Fig 5F).

LPS administration decreased thiol content, and this was only prevented by TA at 60 mg/kg ($F_{(4,21)} = 4.439$, $P < 0.01$; Table 1). No differences in GPx activity were observed ($F_{(4,19)} = 1.770$, $P > 0.05$; Table 1).

3.5 Glutathione S-transferase (GST) activity in hippocampus, cerebral cortex and striatum

No significant changes in GST activity were observed following LPS administration on any of the pretreatment groups in the hippocampus ($F_{(4,19)} = 1.273$, $P > 0.05$), cerebral cortex ($F_{(4,17)} = 0.333$, $P > 0.05$), or striatum ($F_{(4,19)} = 1.648$, $P > 0.05$; Table 1).

3.6 Effect of TA on TNF- α levels in cerebral cortex, hippocampus and striatum

LPS increased TNF- α levels in the cerebral cortex ($F_{(3,12)} = 11.14$, $P < 0.001$; Fig 6A), hippocampus ($F_{(3,12)} = 7.740$, $P < 0.001$; Fig 6B), and striatum ($F_{(3,12)} = 5.664$, $P < 0.01$; Fig 6C), demonstrating the proinflammatory action of LPS in this animal model. TA (60 mg/kg) reduced this increase in the cerebral cortex, while fluoxetine was effective at reducing TNF levels in the hippocampus and cerebral cortex.

3.7 Body weight

Body weight of mice did not change significantly during treatment (data not shown).

4. Discussion

In the present study, TA was able to prevent oxidative stress, neuroinflammation and depressive-like behavior in LPS-induced acute model of depression. It is well known that peripheral administration of LPS induces brain inflammation and depressive-like behavior [20, 34]. This component of gram-negative bacteria activates macrophages, increasing cytokine release in the CNS by activating toll-like receptor 4 (TLR-4) and nuclear translocation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) [35]. Neural inflammation causes immune and endocrine responses, which have been related to depressive symptomatology, and these alterations are observed in this LPS model of depressive-like behavior [36].

Behavioral despair induced by LPS can be observed in the TST and FST [21, 37]. In our study, it was observed that animals administered LPS exhibited depressive-like behaviors, as shown by increased duration of immobility when compared with controls. Additionally, LPS reduced grooming time in the ST, a parameter that evaluates the self-care and motivational behavior in mice [24]. In contrast, TA

demonstrated antidepressant-like effects, by reducing the immobility time in the TST and FST, and increasing grooming time in the ST. This corroborated with a previous study in which an extract containing a phenolic acid as a major compound exhibited antidepressant activity in the LPS-induced acute model of depression [38].

OFT evaluates locomotion and motor activity in mice. This test is commonly used to assess the stimulant or sedative effects of compounds [39]. We demonstrated that LPS did not produce any difference in the number of crossings, an effect that has been reported previously [4, 37]. It is known that 24 h after LPS injection, mice have depressive-like behavior without displaying signs of sickness such as a decreased locomotion [34]. In addition, TA did not alter locomotory (number of crossings) or exploratory (number of rearings) behavior, showing that this compound did not cause psychostimulant activity.

Natural compounds have general health benefits and are investigated for prevention and treatment of neurological disorders. However, little information is available regarding their ability to reach the CNS [16]. The polyphenols need to transpass the blood-brain barrier (BBB) in an appropriate concentration to exert its biological activities. The BBB have active efflux transport processes, mainly ABC transporters (such as P-glycoprotein), for the entry's regulation of these molecules [55]. Although TA is a large polyphenol, it is transformed in smaller tannins, like gallic acid, pyrogallol and phloroglucinol. These absorbable metabolites are biologically active in various organs, including the brain [56, 57]. In this context, *in vivo* model of Alzheimer's disease and glioblastoma multiforme have shown that TA administration elicits neuroprotective actions [57-59]. The exactly biodisponibility of TA is not known. However, more studies about its kinetics properties are necessary.

Oxidative stress has been implicated in neurodegenerative and neuropsychiatric diseases [40]. Dysregulated redox signaling raises the production of reactive species and decreases antioxidant defenses, which can damage biomolecules such as proteins and fatty acids. This results in membrane depolarization and the uncoupling of oxidative phosphorylation, impairing mitochondrial function [15]. Total antioxidant capacity is decreased in depressed patients and treatment with antidepressant drugs has been shown to increase this capacity [41]. Herein, we provide evidence that LPS induced brain oxidative stress by enhancing the levels of TBARS, nitrite, and ROS, as well as decreasing CAT activity and *sulphydryl* (SH) content. TA pretreatment prevented these changes, demonstrating an antioxidant

mechanism of action, an effect that was more pronounced at the higher dose of 60 mg/kg. Corroborating these findings, a previous study from our group reported that TA treatment prevented oxidative damage induced by streptozotocin in a rat model of sporadic Alzheimer's dementia [19].

CAT utilizes its heme group to catalyze decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen, and it is an important member of the antioxidant defense system [42]. This enzyme may be impaired in depressed patients, due to a compensatory mechanism aimed at attenuating oxidative stress [7]. GPx catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and GST detoxifies xenobiotics and oxidative stress products, with both enzymes using glutathione as a substrate [7, 43]. In our study, LPS reduced CAT activity in all structures tested, but did not alter GPx or GST activities. Regarding protein and non-protein thiol groups, LPS reduced this marker in the cerebral cortex and striatum of mice. TA restored CAT activity and thiol levels in the striatum. Although we cannot precisely establish the mechanism involved in the effects of TA, we propose that this natural compound acts to prevent protein oxidation.

TA is a polyphenol with a large antioxidant capacity, due to its capacity to complex with iron (II) ion and inhibits the Fenton reaction [18, 44]. Thus, it could be speculated that less hydrogen peroxide production occurred in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum, as TA was able to reduce ROS production in these structures. Given that the mitochondria are the main site of free radical generation [45], it is feasible that TA acts to prevent the production of reactive species in this organelle. This is further supported by a number of studies that show mitochondrial dysfunction in patients with MDD [46-48].

It is well known that lipid peroxidation begins with the addition of a hydroxyl radical to an unsaturated lipid, generating a lipid hydroperoxide [49]. TA may neutralize this intermediate molecule, preventing the generation of more toxic compounds such as malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). This is likely why TA pretreatment reduces the levels of TBARS in the cerebral cortex, hippocampus and striatum. Lipid peroxidation can generate immunogenic epitopes, leading to immune responses and damage to cell membranes [50]. This data reinforces the relevance of reducing lipid peroxidation, since lipid damage may contribute to the pathophysiological processes involved in MDD.

Systemic challenge with LPS in mice involves an interaction with TLR-4, and this could be related to the activation of inflammasome signaling molecules, including

the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLRP) 3. This protein complex can mediate a rapid immune response, such as interleukin 1 beta (IL-1 β) production [51]. Previous studies have shown that TA inhibits this inflammasome in cultured macrophages [52]. Moreover, ROS can interact with NLRP3 and promote its activation, and further stimulate the generation of more reactive species [51]. In our study, LPS increased ROS levels in the cerebral cortex, hippocampus and striatum and TA pretreatment (30 & 60 mg/kg) prevented this increase. Considering these findings, we could speculate that TA modulates the NLRP3 pathway in LPS-induced depression, reducing ROS production.

TA was able to suppress the NF- κ B pathway in macrophage and microglial cultures, possibly by increasing the expression of I κ B- α , a protein that remains anchored to p50 and p65 subunits [52, 53]. Thus, blockade of p65 translocation to the nucleus occurred, inhibiting activation of the NF- κ B pathway. Consequently, the production of pro-inflammatory mediators is decreased, including TNF- α , oxidative molecules as such as nitrite, and ROS levels [52, 53]. In addition to this pre-clinical evidence, depressive patients have higher serum levels of pro-inflammatory cytokines such interleukin (IL) IL-6 and TNF- α [6]. Considering that oxidative stress can stimulate the NF- κ B pathway [54] and that TA prevented the LPS-induced increase of nitrite, ROS and TNF- α , it is possible that regulation of the NF- κ B pathway is involved in the neuroprotection elicited by TA.

In conclusion, our findings provide evidence for a neuroprotective effect of TA, eliciting antioxidant, anti-inflammatory and antidepressant actions in an animal model of depression (Figure 7). Therefore, TA could be a promising tool in the prevention of depression.

Acknowledgments

The Brazilian research funding agencies Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance code 001) supported this study.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

References

1. Krishnadas R, Cavanagh J (2012) Depression: an inflammatory illness? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:495-502.
2. Grahek I, Shenhav A, Musslick S, Krebs RM, Koster EHW (2019) Motivation and cognitive control in depression. *Neurosci Biobehav Rev* 102:371-381.
3. Adebessin A, Adeoluwa OA, Eduviere AT, Umukoro S (2017) Methyl jasmonate attenuated lipopolysaccharide-induced depressive like behaviour in mice. *J Psychiatr Res* 94:29-35.
4. Sulakhiya K, Kumar P, Jangra A, Dwivedi S, Hazarika NK, Baruah CC, Lahkar M (2014) Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. *Eur J Pharmacol* 744:124-131.
5. Umukoro S, Adebessin A, Agu G, Omorogbe O, Asehinde SB (2018) Antidepressant-like activity of methyl jasmonate involves modulation of monoaminergic pathways in mice. *Adv Med Sci* 63:36-42.
6. Moylan S, Berk M, Dean OM, Samuni Y, Williams LJ, O'Neil A, Hayley AC, Pasco, JA, Anderson G, Jacka FN, Maes M (2014) Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? *Neurosci Biobehav Rev* 45:46-62.
7. Maes M, Galecki P, Chang YS, 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. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:676-692.
8. Schieber M, Chandel NS (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol* 24:453-462.
9. Maurya PK, Noto C, Rizzo LB, Rios AC, Nunes SO, Barbosa DS, Sethi S, Zeni M, Mansur RB, Maes M, Brietzke E (2016) The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 65:134-144.
10. Zhao Y, Wang Q, Jia M, Fu S, Pan J, Chu C, Liu X, Liu X, Liu Z (2019) (+)-Sesamin attenuates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and memory deficits *via* suppression of neuroinflammation. *J Nutri Biochem* 64:61-71.
11. Furtado M, Katzman MA (2015) Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Res* 229:27-36.

12. Rodrigo R, Gil-Becerra D (2014) Implications of Polyphenols on Endogenous Antioxidant Defense Systems in Human Diseases. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S (eds) *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press, pp 201-217.
13. Vauzour D, Kerr J, Czank C (2014) Plant Polyphenols as Dietary Modulators of Brain Functions. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S (eds) *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press, pp 357-370.
14. Zhu W-L, Shi H-S, Wei Y-M, Wang S-J, Sun C-Y, Ding Z-B, Lin L (2012) Green tea polyphenols produce antidepressant-like effects in adult mice. *Pharmacol Res* 65:74-80.
15. Lopes GKB, Schulman HM, Hermes-Lima M (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ion. *Biochim Biophys Acta* 1472:142-152.
16. Gerzson MFB, Pacheco SM, Soares MSP, Bona NP, Oliveira PS, Azambuja JH, da Costa P, Gutierrez JM, Carvalho FB, Morsch VM, Spanevello RM, Stefanello FM (2019) Effects of tannic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's Disease: insights into memory, redox status, Na⁺,K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activity. *Arch Physiol Biochem* 9:1-8.
17. Fakhoury, M (2015) New insights into the neurobiological mechanisms of major depressive disorders. *Gen Hosp Psychiatry* 37:172-177.
18. Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, Cui R (2017) The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast* 2017:1-11.
19. Báez-Mendonza R, Schultz W (2013) The role of striatum in social behavior. *Front Neurosci* 7:1-14.
20. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R (2009) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 14:511-522.
21. Zhu L, Luo F, Pan H, Zhang K, Liu J, Zhou R, Gao J, Chang X, He H, Qiu Y, Wang J, Long H, Ya T (2016) Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. *Physiol Behav* 163:184-192.

22. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.
23. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85:367-370.
24. Yalcin I, Aksu F, Belzung C (2005) Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur J Pharmacol* 514:165-174.
25. Ali SF, Lebel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13:637-648.
26. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145.
27. Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421.
28. Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543-1555.
29. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
30. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175.
31. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
33. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
34. Taniguti EH, Ferreira YS, Stupp IJV, Fraga-Junior EB, Doneda DL, Lopes L, Rios-Santos F, Lima E, Buss ZS, Viola GG, Vandesen-Filho S (2019) Atorvastatin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in mice. *Brain Res Bull* 146:279-286.
35. Café-Mendes CC, Garay-Malpartida HM, Malta MB, Scavone C, Ferreira ZS, Markus RP, Marcourakis T (2017) Chronic nicotine treatment decreases LPS

- signaling through NF- κ B and TLR-4 modulation in the hippocampus. *Neurosci Lett* 636:218-224.
36. Sens J, Schneider E, Mauch J, Schaffstein A, Mohamed S, Fasoli K, Saurine J, Britzokali A, Thelen C, Pitychoutis PM (2017) Lipopolysaccharide administration induces sex-dependent behavioural and serotonergic neurochemical signatures in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 153:168-181.
 37. Gawali NB, Bulani VD, Chowdhury AA, Deshpande PS, Nagmoti DM, Juvekar AR (2016) Agmatine ameliorates lipopolysaccharide induced depressive-like behaviour in mice by targeting the underlying inflammatory and oxido-nitrosative mediator. *Pharmacol Biochem Behav* 149:1-8.
 38. Dalmagro AP, Camargo A, Rodrigues ALS, Zeni ALB (2019) Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in the antidepressant-like and neuroprotective effects of *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid. *Chem Biol Interact* 314:1-11.
 39. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE (2009) The Open Field Test: Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods* 42:1-20.
 40. Migliore L, Coppede F (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res* 31:73-84.
 41. Chang CC, Lee CT, Lan TH, Ju PC, Hsieh YH, Lai TJ (2015) Effects of antidepressant treatment on total antioxidant capacity and free radical levels in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res* 230:575-580.
 42. Gebicka L, Krych-Madej J (2019) The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *J of Inorganic Biochem* 197:110699.
 43. Dasari S, Gonuguntla S, Ganjari MS, Bukke S, Sreenivasulu B, Meriga B (2018) Genetic polymorphism of glutathione S-transferases: Relevance to neurological disorders. *Pathophysiol* 25:285-292.
 44. Andrade Jr RG, Ginani JS, Lopes GKB, Dutra F, Alonso A, Hermes-Lima M (2006) Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochimie* 88:1287-1296.
 45. Lushchak VI (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224:164-175.
 46. Moylan S, Maes M, Wray NR, Berk M (2013) The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry* 18:595-606.

47. Allen J, Romay-Tallon R, Brymer KJ, Caruncho HJ, Kalynchuk LE (2018) Mitochondria and Mood: Mitochondrial Dysfunction as a Key Player in the Manifestation of Depression. *Front Neurosci* 12:386.
48. Czarny P, Wigner P, Galecki P, Sliwinski T (2018) The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 80:309-321.
49. El-Aal HAHMA (2012) Lipid Peroxidation End-Products as a Key of Oxidative Stress: Effect of Antioxidant on Their Production and Transfer of Free Radicals. *Lipid Peroxidation*, Angel Catala, IntechOpen, DOI: 10.5772/45944.
50. Mazereeuw G, Herrmann N, Andreazza AC, Khan MM, Lanctôt KL (2015) A meta-analysis of lipid peroxidation markers in major depression. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11:2479-2491.
51. Mello BSF, Chaves Filho AJM, Custódio CS, Cordeiro RC, Miyajima F, de Sousa FCF, Vasconcelos SMM, de Lucena DF, Macedo D (2018) Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. *J Neuroimmunol* 320:133-142.
52. Song D, Zhao J, Deng W, Liao Y, Hong X, Hou J (2018) Tannic acid inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production via blocking NF- κ B signaling in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 503:3078-3085.
53. Wu Y, Zhong L, Yu Z, Qi J (2019) Anti-neuroinflammatory effects of tannic acid against lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells via inhibition of NF- κ B activation. *Drug Dev Res* 80:262-268.
54. Lingappan K (2018) NF- κ B in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol* 7:81-86.
55. Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszeka S, Deli MA (2014) Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res* 45:610-638.
56. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F (2009) Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res* 53:310-329.
57. Mori T, Rezai-Zadeh K, Koyama N, Arendash GW, Yamaguchi H, Kakuda N, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T (2012) Tannic Acid Is a Natural B-Secretase Inhibitor That Prevents Cognitive Impairment and Mitigates Alzheimer-like Pathology in Transgenic Mice. *J Biol Chem* 287:6912-6927.

58. Gerzson MFB, Bona NP, Soares MSP, Teixeira FC, Rahmeier FL, Carvalho FB, da Cruz Fernandes M, Onzi G, Lenz G, Gonçalves RA, Spanevello RM, Stefanello FM (2020) Tannic Acid Ameliorates STZ-Induced Alzheimer's Disease-Like Impairment of Memory, Neuroinflammation, Neuronal Death and Modulates Akt Expression. *Neurotox Res*, *in press*.
59. Bona NP, Pedra NS, Azambuja JH, Soares MSP, Spohr L, Gelsleichter NE, Meine BM, Sekine FG, Mendonça LT, de Oliveira FH, Braganhol E, Spanevello RM, da Silveira EF, Stefanello FM (2020) Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. *Metab Brain Dis* 35:283-293.

Figure captions

Figure 1. Experimental protocol design.

Figure 2. Effect of tannic acid (TA) and fluoxetine (Flu) pretreatment on locomotory and immobility behaviors following lipopolysaccharide (LPS) treatment. (A) Locomotor activity in open field test. (B) Immobility time in the forced swimming test. (C) Immobility time in the tail suspension test. The tests were conducted 24 h after saline or LPS administration. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M (n = 5-9 animals per group). ** P <0.01, *** P <0.001 verses vehicle. ## P <0.01, ### P <0.001 verses LPS. One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Figure 3. Effect of tannic acid (TA) and fluoxetine (Flu) pretreatment on grooming behaviors following lipopolysaccharide (LPS) treatment, evaluated by the splash test. (A) Grooming time. (B) Grooming latency. The test was assessed 24 h after saline or LPS administration. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M (n = 6-9 animals per group). ** P <0.01 verses vehicle. # P <0.05 vs. LPS; ### P <0.001 verses LPS. One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Figure 4. Effect of tannic acid (TA) and fluoxetine (Flu) pretreatment on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reactive oxygen species (ROS) and nitrite levels in various brain regions following lipopolysaccharide (LPS) administration. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M (n = 4-7 animals per group). ** P <0.01, *** P <0.001 verses vehicle. # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001 verses LPS. One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Figure 5. Effect of tannic acid (TA) and fluoxetine (Flu) pretreatment on catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity in various brain regions following lipopolysaccharide (LPS) administration. Data are reported as mean $\pm$ S.E.M (n = 4-7 animals per group). * P <0.05, *** P <0.001 verses vehicle. ## P <0.01, ### P <0.001 verses LPS. One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Figure 6. Effect of tannic acid (TA) and fluoxetine (Flu) pretreatment on TNF- α levels in various brain regions following lipopolysaccharide (LPS) administration. Data are

reported as mean $\pm$ S.E.M (n = 4-5 animals per group). * P <0.05, ** P <0.01 verses vehicle. # P <0.05, ## P <0.01 verses LPS. One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Figure 7. Overview of tannic acid (TA) effects on behavioral and neurochemical parameters in lipopolysaccharide-induced depression.

Table 1. Effect of tannic acid and fluoxetine treatment on total thiol content, glutathione peroxidase (GPx) and Glutathione S-transferase (GST) activities in hippocampus, cerebral cortex and striatum of mice submitted to LPS-induced depression.

	Vehicle	LPS	LPS + Fluoxetine	LPS + TA (30 mg/kg)	LPS + TA (60 mg/kg)
Hippocampus					
Total thiol content	48.78 ± 2.05	46.20 ± 3.93	47.31 ± 2.83	49.47 ± 3.32	49.05 ± 5.71
GPx activity	54.37 ± 8.22	62.43 ± 8.13	53.12 ± 1.77	23.54 ± 3.76	29.16 ± 2.26
GST activity	3169 ± 562.0	2725 ± 305.6	3289 ± 508.3	3124 ± 195.4	3881 ± 263.5
Cerebral cortex					
Total thiol content	73.38 ± 1.78	48.0 ± 2.80***	59.72 ± 2.58	56.80 ± 3.81	59.94 ± 4.638
GPx activity	21.47 ± 3.94	19.82 ± 5.93	26.96 ± 5.85	21.33 ± 2.69	42.97 ± 8.764
GST activity	2185 ± 385.6	2494 ± 234.2	2364 ± 570.6	2154 ± 346.0	2735 ± 282.4
Striatum					
Total thiol content	61.71 ± 4.044	43.92 ± 1.923*	56.77 ± 2.624	50.62 ± 3.422	61.89 ± 5.18 [#]
GPx activity	61.74 ± 11.74	54.68 ± 13.67	77.57 ± 14.03	37.96 ± 3.30	47.76 ± 5.12
GST activity	6331 ± 332.9	4506 ± 345.6	5014 ± 402.3	4981 ± 825.2	4073 ± 876.0

Data are reported as mean ± S.E.M (n = 4-6 animals per group). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared to vehicle group. [#] $P < 0.05$ compared to lipopolysaccharide (LPS) group. One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Figure 1

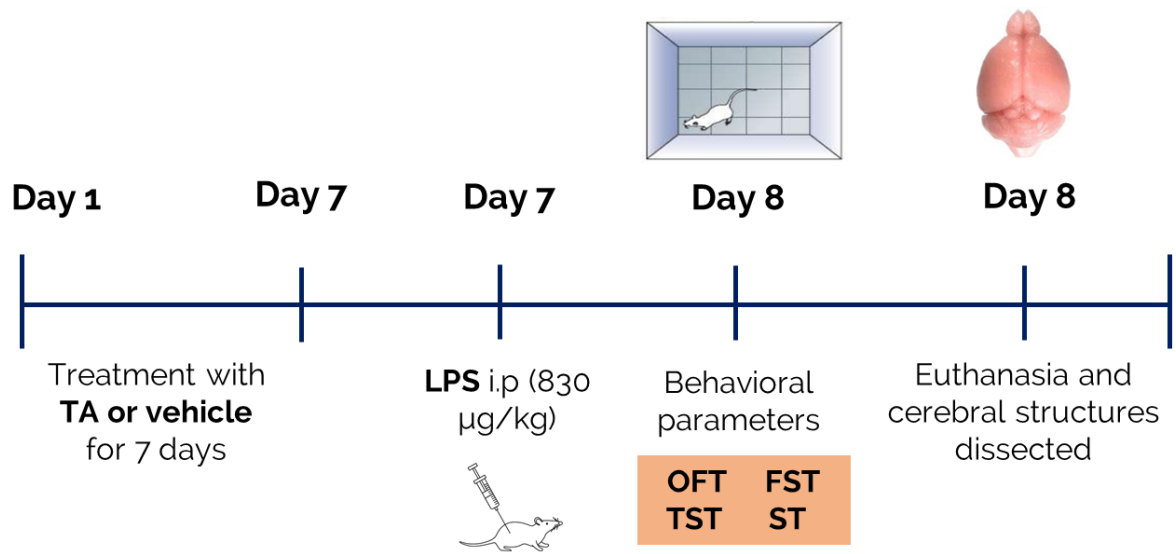


Figure 2

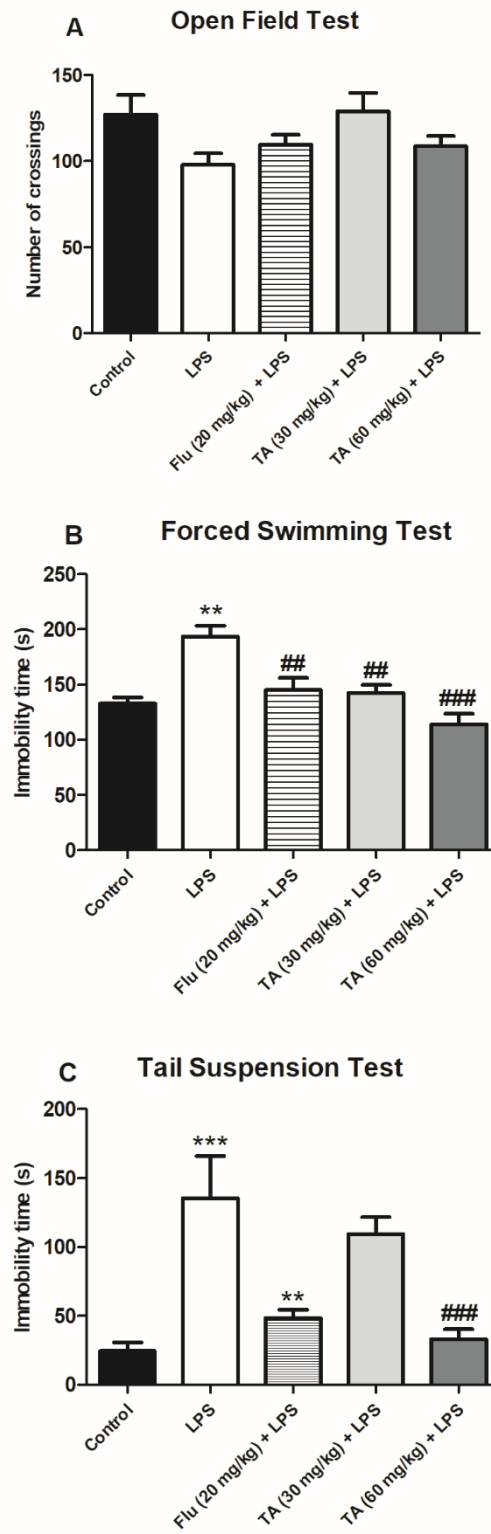


Figure 3

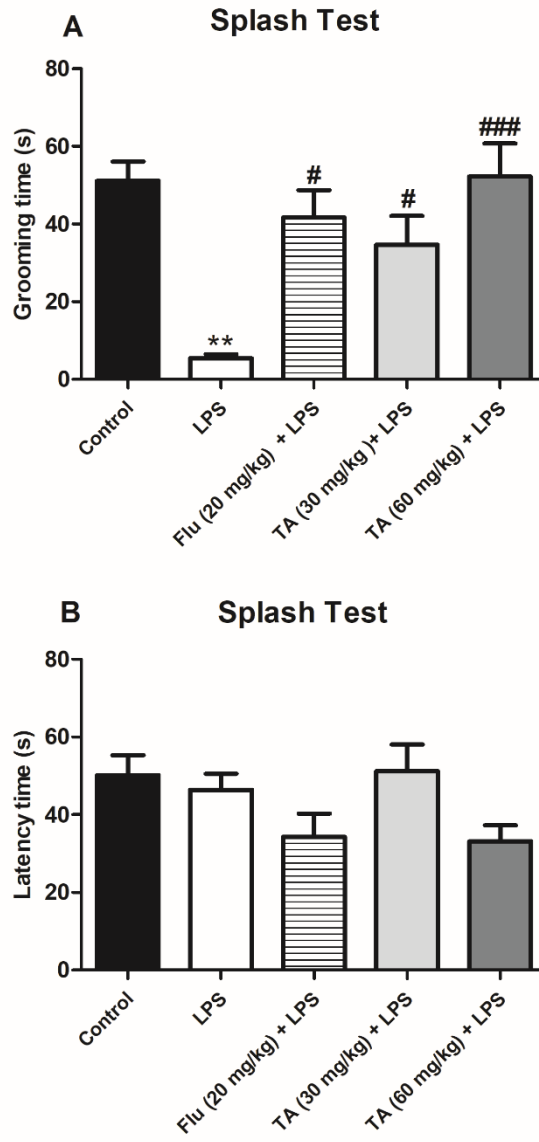


Figure 4

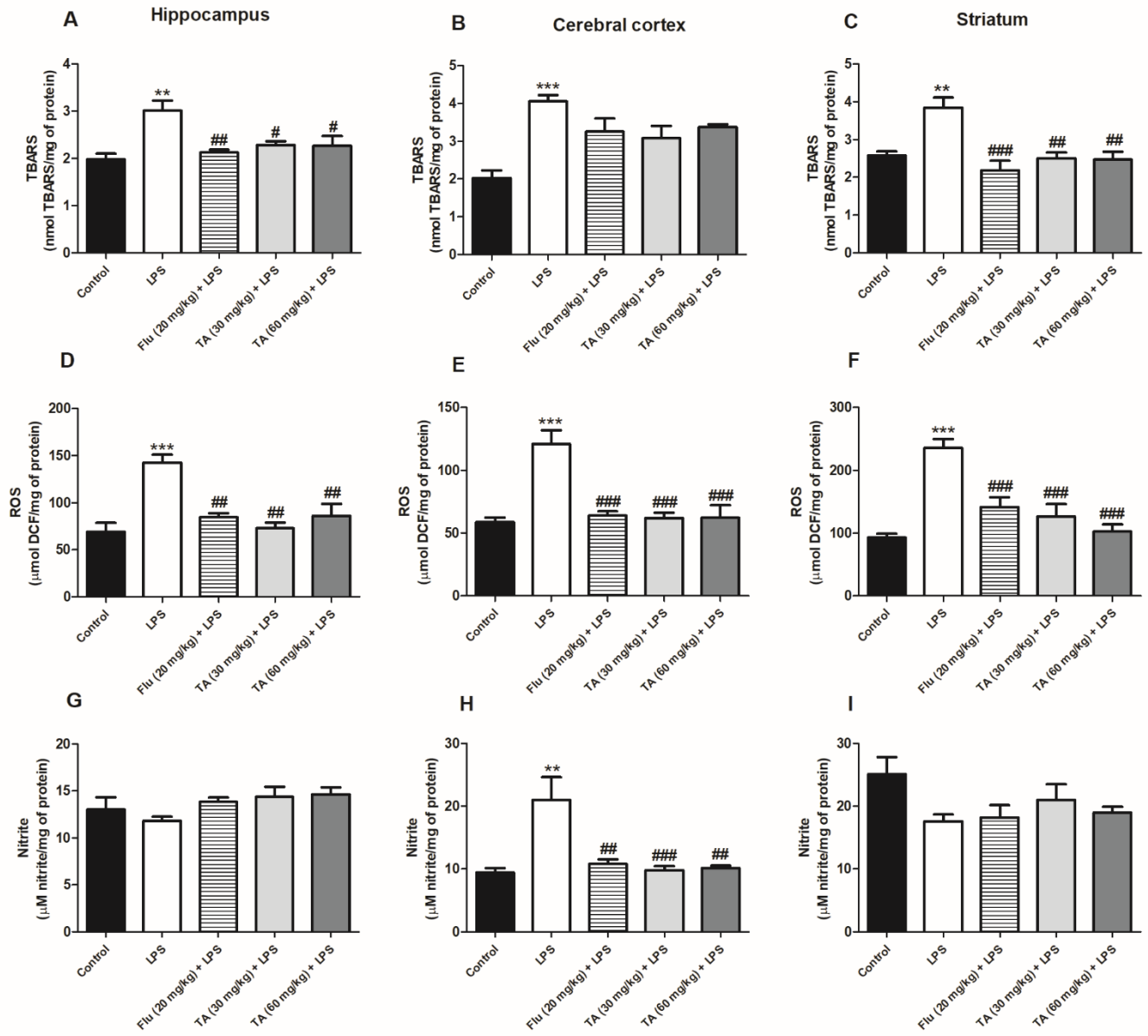


Figure 5

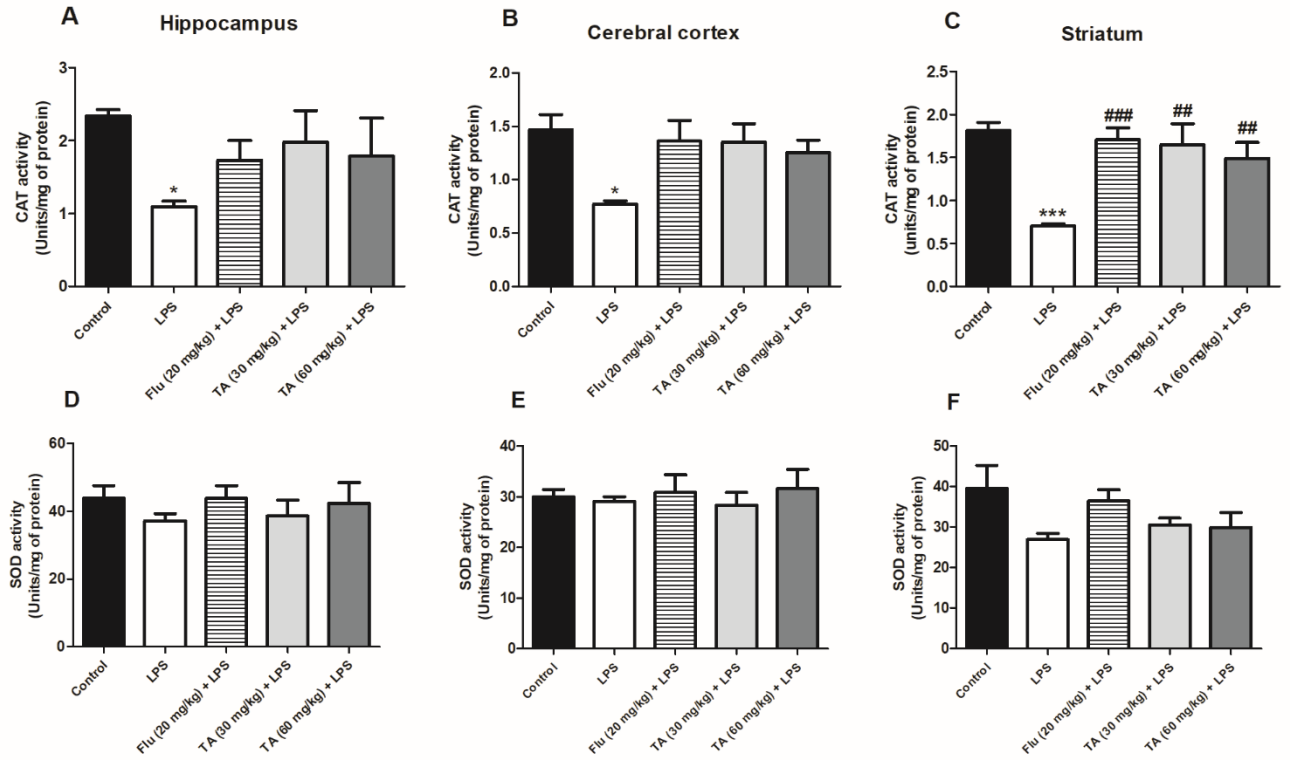


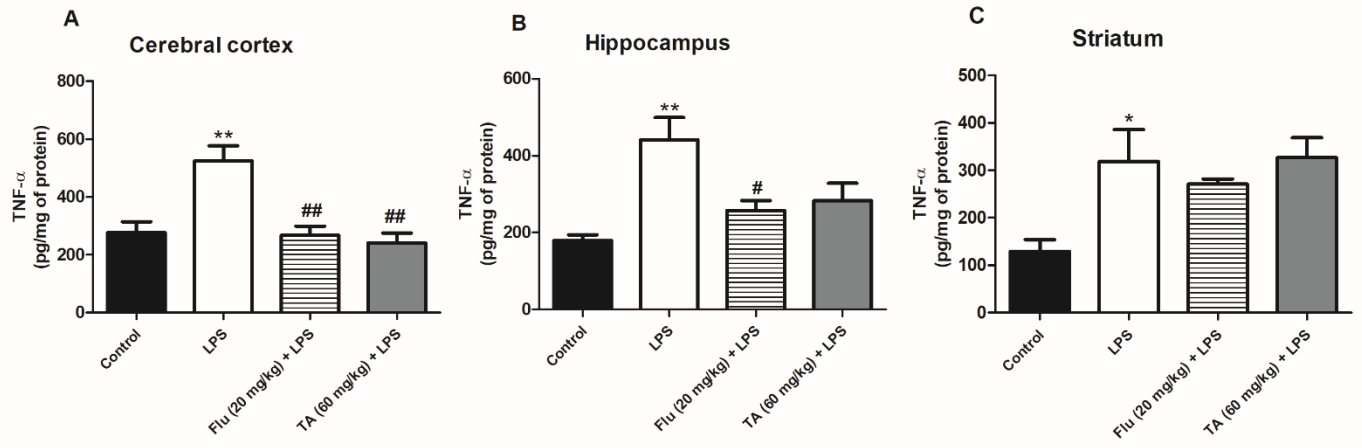
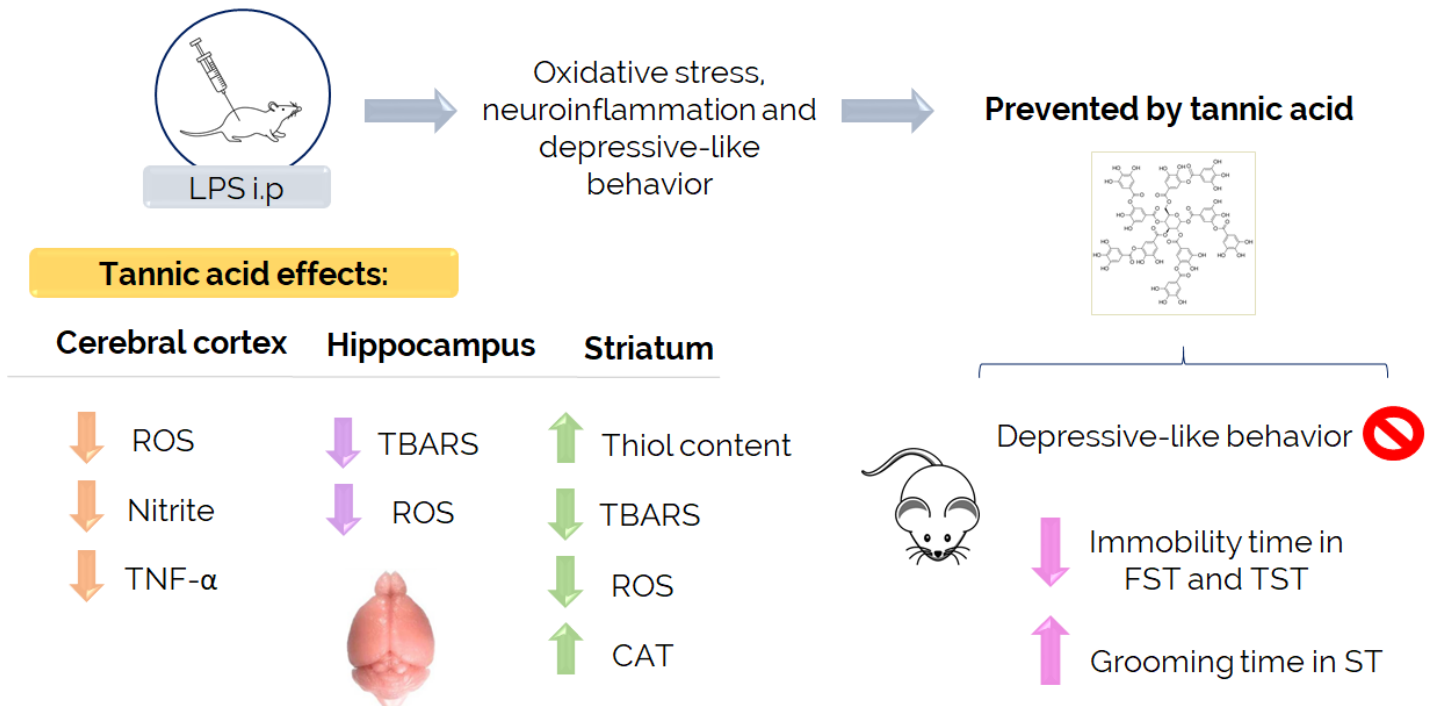
Figure 6

Figure 7



6. Considerações finais

O tratamento com AT preveniu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS no TSC, TNF e TBF. Além disso, no TCA não foram observadas alterações locomotoras no grupo tratado. Os testes comportamentais realizados são referência na triagem de compostos com possível atividade tipo-antidepressiva. Sendo assim, resultados promissores foram obtidos com o tratamento.

A investigação dos parâmetros de estresse oxidativo demonstrou o efeito preventivo do AT em relação aos níveis de TBARS, ERO, nitritos e sulfidrilas, além da modulação da atividade da CAT. Portanto, o polifenol utilizado foi capaz de atenuar o estresse oxidativo induzido pelo LPS.

Em relação ao parâmetro inflamatório analisado, observamos que os níveis de TNF- α aumentaram significativamente com a administração de LPS. Entretanto, o AT demonstrou um efeito neuroprotetor no córtex cerebral. Assim, podemos sugerir que o composto utilizado pode também atuar em vias relacionadas a neuroinflamação.

Os resultados obtidos sugerem uma ação tipo-antidepressiva do AT por meio da atenuação do estresse oxidativo em córtex cerebral, hipocampo e estriado e da redução dos níveis de TNF- α no córtex cerebral e, possivelmente, de outros mediadores pró-inflamatórios. Mais estudos são necessários para investigar os mecanismos envolvidos na ação do AT, contribuindo assim na busca de terapias alternativas para o TDM.

Como perspectivas, outros parâmetros serão analisados no modelo agudo de depressão induzido por LPS, como marcadores inflamatórios (IL-2, IL-6) e análises moleculares (expressão de NF-kB). Além disso, pretendemos investigar o efeito do pré-tratamento com AT no modelo de privação materna.

7. Referências

- AL-HARBI et al. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. **Patient Preference and Adherence**, v. 6, p. 369–388, 2012.
- ANDERSEN & WINTER. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2017.
- ANISMAN et al. Chapter 8 - Depressive Disorders. **The Immune System and Mental Health**, p. 259-300, 2018.
- ARAPITSAS, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1708-1717, 2012.
- ATHAR et al. Effect of dietary tannic acid on epidermal, lung, and forestomach polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and tumorigenicity in Sencar mice. **Cancer Research**, v. 49, n. 5784, 1989.
- BARBOSA et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BAUD et al. Glutathione Peroxidase-Catalase Cooperativity is Required for Resistance to Hydrogen Peroxide by Mature Rat Oligodendrocytes. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1531-1540, 2004.
- BELMAKER & AGAM. Major Depressive Disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 55-68, 2008.
- BERTON & NESTLER. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 137-151, 2006.
- BLACK et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164-175, 2015.
- BOARD et al. Depressive affect and endocrine functions: blood levels of adrenal cortex and thyroid hormones in patients suffering from depressive reactions. **Archives of Neurology & Psychiatry**, v. 78, p. 612-620, 1957.
- BONA et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, p. 283-293, 2020.
- BOSSHART & HEINZELMANN. Targeting Bacterial Endotoxin: Two Sides of a Coin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1096, p. 1-17, 2007.
- BRANDÃO et al. Quality control of tannic acid from some pharmacies of campo grande city (ms), Brazil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 33-38, 2008.
- CESKOVA. Current pharmacotherapy of depression – focused on multimodal/multifunctional antidepressants. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 14, p. 1835-1837, 2016.
- CHEN & CHUNG. Mutagenicity and Antimutagenicity Studies of Tannic Acid and its Related Compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 1-5, 2000.
- CHEN et al. Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammation driven by macrophages. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 5, p. 853-864, 2015.
- CHUNG et al. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.
- CLEARE & DUNCKO. Pharmacological management of depressive disorders. **Medicine**, v. 44, n. 12, p. 756-760, 2016.
- CORP et al. A review of the use of stimulants and stimulant alternatives in treating bipolar depression and major depressive disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, n. 75, v. 9, p. 1010–1018, 2014.

- CULMSEE et al. Mitochondria, Microglia, and the Immune System—How Are They Linked in Affective Disorders? **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, n. 739, p. 1-12, 2019.
- DANTZER. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 247-264, 2009.
- DARVIN et al. Tannic acid inhibits EGFR/STAT1/3 and enhances p38/STAT1 signalling axis in breast cancer cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 720-734, 2016.
- DAS et al. Protection against chemically induced skin tumorigenesis in Sencar mice by tannic acid. **International Journal of Cancer**, v. 43, n. 468, 1989.
- De VOS et al. An investigation of emotion dynamics in major depressive disorder patients and healthy persons using sparse longitudinal networks. **Plos One**, v. 6, p. 1-18, 2017.
- DEAN & KESHAVAN. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 27, p. 101–111, 2017.
- DEL PORTO. Conceito e diagnóstico – Depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 6-11, 1999.
- Depression and Other Common Mental Disorders - Global Health Estimates. **World Health Organization**, 2017.
- ELHWUEGI. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, p. 435–445, 2004.
- FELGER et al. Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. **Molecular Psychiatry**, v. 21, p. 1358-1365, 2016.
- FRAGA et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food & Function**, v. 10, p. 514-528, 2019.
- FRODL et al. Reduced expression of glucocorticoid-inducible genes GILZ and SGK-1: high IL-6 levels are associated with reduced hippocampal volumes in major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, v. 2, 2012.
- GERZSON et al. Effects of tannic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's Disease: insights into memory, redox status, Na⁺, K⁺ -ATPase and acetylcholinesterase activity. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 9, p. 1-8, 2019.
- GOLDBERG et al. Revisiting the Monoamine Hypothesis of Depression: A New Perspective. **Perspectives in Medical Chemistry**, v. 6, p. 1-8, 2014.
- GOMEZ-PINILLA & NGUYEN. Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 127-133, 2012.
- HEPGUL et al. Depression pathogenesis and treatment: what can we learn from blood mRNA expression? **BMC Medicine**, v. 11, p. 1-13, 2013.
- HOSTENBACH et al. Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 39-41, 2014.
- HSIEH, H.; YANG, C. Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-18, 2013.
- JAYASEKARA et al. Cognitive behavioral therapy for older adults with depression: a review. **Journal of Mental Health**, v. 30, p. 1-4, 2014.
- JESULOLA et al. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v. 341, p. 79-90, 2018.

- JIMOH et al. Antioxidant potentials of tannic acid on lipid peroxidation induced by several pro-oxidants in cerebral and hepatic lipids. **International Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, p. 14-20, 2016.
- JURUENA et al. Atypical depression and non-atypical depression: Is HPA axis function a biomarker? A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 233, p. 45–67, 2018.
- KAUFMANN et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 64, p. 367-383, 2017.
- KEMPURAJ et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v. 1, p. 1-15, 2016.
- KHANZODE et al. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Reports**, v. 8, p. 365-370, 2003.
- KIM & WON. The influence of stress on neuroinflammation and alterations in brain structure and function in major depressive disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 329, p. 6-11, 2017.
- KIM et al. Mitochondria, metabolism and redox mechanisms in psychiatric disorders. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 31, p. 275-317, 2019.
- KIM et al. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 277-284, 2016.
- KRISHNAN & NESTLER. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 7, p. 121-147, 2011.
- KUO et al. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 270, p. 87-95, 1992.
- KUPFER et al. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. **Lancet**, v. 379, p. 1045-1055, 2012.
- LAWSON et al. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 1-12, 2013.
- LEE et al. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 1-14, 2008.
- LINDQVIST et al. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 76, p. 197-205, 2017.
- LOPES et al. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, p. 142-152, 1999.
- LOTTRICH. Inflammatory cytokine-associated depression. **Brain Research**, v. 1617, p. 113-125, 2015.
- MAES et al. 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 & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 676-692, 2011.
- MALHI & MANN. Depression. **Lancet**, v. 392, p. 2299-2312, 2018.
- MATTOS. Mecanismo da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro. **Dissertação (Mestrado em Química)** - Programa de Pós-graduação em Química da Universidade de Brasília, 2009.

- MAURYA et al. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 65, p. 134-144, 2016.
- MCKAY & ZAKZANIS. The impact of treatment on HPA axis activity in unipolar major depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, p. 183–192, 2010.
- MILLER et al. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, p. 732-741, 2009.
- MISIAK et al. Cytokine alterations and cognitive impairment in major depressive disorder: From putative mechanisms to novel treatment targets. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 80, p. 177-188, 2018.
- MOUSSAVI et al. Depressive, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. **Lancet**, v. 370, p. 851-858, 2007.
- MOYLAN et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 45, p. 46-62, 2014.
- MURRI et al. HPA axis and aging in depression: Systematic review and meta-analysis. **Psychoendocrinology**, v. 41, p. 46-62, 2014.
- O'CONNOR et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 14, p. 511-522, 2009.
- PARIANTE & LIGHTMAN. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends in Neurosciences**, v. 3, p. 464-468, 2008.
- PHIWCHA et al. Tannic acid (TA): A molecular tool for chelating and imaging labile iron. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 64-73, 2018.
- PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 299-312, 2005.
- QIN et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, v. 55, p. 453-462, 2007.
- RAMIREZ et al. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 1-21, 2017.
- RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, p. 777-783, 2016.
- REMUS & DANTZER. Inflammation Models of Depression in Rodents: Relevance to Psychotropic Drug Discovery. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 1-13, 2016.
- RIBEIRO et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 133-149, 2005.
- RUSH et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, p. 1905-1917, 2006.
- SATO et al. Chronic intraperitoneal injection of interferon-alpha reduces serotonin levels in various regions of rat brain, but does not change levels of serotonin transporter mRNA, nitrite or nitrate. **Psychiatry & Clinical Neurosciences**, v. 60, p. 499-506, 2006.
- SCHNEIDER & OLIVEIRA. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.
- SERLIN et al. Anatomy and physiology of blood-brain-barrier. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 38, p. 2-6, 2015.

- SHARIQ et al. Evaluating the role of orexins in the pathophysiology and treatment of depression: A comprehensive review. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 92, p. 1-7, 2019.
- SÖDERLUND & LINDSKOG. Relevance of Rodent Models of Depression in Clinical Practice: Can We Overcome the Obstacles in Translational Neuropsychiatry? **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 1-9, 2018.
- SOFRONIEW & VINTERS. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, p. 7-35, 2010.
- SONG et al. Tannic acid inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1b production via blocking NF-kB signaling in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, p. 3078-3085, 2018.
- THURGUR, H.; PINTEAUX, E. Microglia in the Neurovascular Unit: Blood–Brain Barrier–microglia Interactions After Central Nervous System Disorders. **Neuroscience**, v. 405, p. 55-67, 2019.
- VASCONCELOS et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.
- VERSTREPEN et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a 65 common theme. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2964-2978, 2008.
- VOLLMER-CONNA et al. Production of pro-inflammatory cytokines correlates with the symptoms of acute sickness behaviour in humans. **Psychological Medicine**, v. 34, p. 1289-1297, 2004.
- WALTER et al. Role of the Toll-Like Receptor 4 in Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 20, p. 947-956, 2007.
- WANG et al. Inhibition of activated astrocyte ameliorates lipopolysaccharide- induced depressive-like behaviors. **Journal of Affective Disorders**, v. 242, p. 52-59, 2018.
- WANG et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. **Translational Neurodegeneration**, v. 4, p. 1-9, 2015.
- WANG et al. The recent progress in animal models of depression. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 77, p. 99-109, 2017.
- WATSON & MACKIN. HPA axis function in mood disorders. **Psychiatry**, v. 8, p. 97-101, 2009.
- WICKENS et al. Repeated daily administration of increasing doses of lipopolysaccharide provides a model of sustained inflammation-induced depressive-like behaviour in mice that is independent of the NLRP3 inflammasome. **Behavioural Brain Research**, v. 352, p. 99-108, 2018.
- XU et al. Leonurine ameliorates LPS-induced acute kidney injury via suppressing ROS-mediated NF-kB Signaling pathway. **Fitoterapia**, v. 97, p. 148-155, 2014.
- YOUNG et al. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, p. 15–20, 2014.
- ZHANG et al. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)- TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. **Current Neuropharmacology**, v. 14, p. 721-731, 2016.
- ZHANG et al. Ginkgetin aglycone ameliorates LPS-induced acute kidney injury by activating SIRT1 via inhibiting the NF-Kb signaling pathway. **Cell & Bioscience**, v. 7, p. 1-10, 2017.
- ZHANG et al. Multi-targeted protection of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by tannic acid. **International Immunopharmacology**, v. 47, p. 95-105, 2017.

ZHANG et al. Tannic acid modulates excitability of sensory neurons and nociceptive behavior and the Ionic mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 764, p. 633-642, 2015.

ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA et al. Effect of tannic acid, resveratrol and its derivatives, on oxidative damage and apoptosis in human neutrophils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 37-46, 2015.

8. Anexos

Anexo A: Documento de Parecer do Cômite de Ética em Experimentação Animal (CEEa/UFPe)



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
108/2019/CEEa/REITORIA
23110.032979/2019-51

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Produtos naturais na prevenção de alterações neuroquímicas e comportamentais em modelo animal de depressão induzido por lipopolissacarídeo”**, registrada com o nº 23110.032979/2019-51, sob a responsabilidade de **Francieli Moro Stefanello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **11 de setembro de 2019**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	18/09/2019 a 01/09/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss
Nº de animais	384
Idade	60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEEa 32979-2019

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEa

18/09/2019

SEI/UFPel - 0708578 - Parecer



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 18/09/2019, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0708578** e o código CRC **8E22D836**.

Referência: Processo nº 23110.032979/2019-51

SEI nº 0708578

Anexo B: Comprovante de submissão do artigo

NEUROCHEMICAL RESEARCH


[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#) • [PRIVACY](#)

Role: **Author** Username: **FStefanello-797**

Submissions Being Processed for Author Francieli Moro Stefanello

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	NERE-D-20-00028	Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid in a lipopolysaccharide-induced model of depression	14 Jan 2020	19 Jan 2020	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Anexo B: comprovante de submissão do artigo**Neurochemical Research****Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid in a lipopolysaccharide-induced model of depression**

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	NERE-D-20-00028
Full Title:	Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid in a lipopolysaccharide-induced model of depression
Article Type:	Original
Keywords:	Natural product; Redox status; Neuroinflammation; Depression; Mice
Corresponding Author:	Francieli Moro Stefanello Universidade Federal de Pelotas BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pelotas
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Karina Pereira Luduvico