



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

ANA CLARA NASS DA CRUZ TORRÁ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA ASSOCIAÇÃO DE  
COLECALCIFEROL E DA CURCUMINA EM UM MODELO ANIMAL DE  
DEPRESSÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

FLORIANÓPOLIS

2022

Ana Clara Nass da Cruz Torr 

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA ASSOCIAÇÃO DE  
COLECALCIFEROL E DA CURCUMINA EM UM MODELO ANIMAL DE  
DEPRESSÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-gradua o  
em Bioquímica da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obten o do título de mestre em  
Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis

2022

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

Nass da Cruz Torr , Ana Clara  
AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA ASSOCIAÇÃO  
DE COLECALCIFEROL E DA CURCUMINA EM UM MODELO ANIMAL DE  
DEPRESSÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO / Ana Clara  
Nass da Cruz Torr  ; orientador, Ana Lúcia Severo  
Rodrigues, 2022.  
97 p.

Disserta o (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Gradua o em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Curcumina. 3. Colecalciferol. 4.  
Depressão. 5. Lipopolissacarídeo. I. Severo Rodrigues, Ana  
Lúcia. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Gradua o em Bioquímica. III. Título.

Ana Clara Nass da Cruz Torrá

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA ASSOCIAÇÃO DE  
COLECALCIFEROL E DA CURCUMINA EM UM MODELO ANIMAL DE  
DEPRESSÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

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

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

Profa. Vivian Binder Neis, Dra.  
UniSociesc

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

*Dedico esse trabalho à minha família, em especial ao meu esposo Lucas, que não mediu esforços e nem distâncias para me ajudar a realizar meus sonhos e que com muito amor, me ajudou a chegar até aqui.*



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à Deus, por me sustentar até aqui nesse período de aquisição de conhecimentos. Gostaria de agradecer à minha família, a meus pais Sueli e Renato, que conviveram com a distância e a saudade com a minha mudança de cidade, que me apoiaram a cada etapa vencida, mandando mensagens de ânimo, coragem, fé e principalmente suas orações em bênçãos. Também agradeço às minhas irmãs, cunhados, meu sobrinho, cunhada, sogros pelo apoio e por sempre depositarem confiança em minhas escolhas;

Ao meu esposo Lucas, de forma especial, pelo acolhimento, amor, cuidado, carinho e principalmente por toda a compreensão, apoio imensurável, por acreditar em mim e por sempre me fazer ver as situações pelo lado positivo. Por sempre cuidar pacientemente de mim, atento sempre aos detalhes, munido das palavras certas de coragem e ânimo. Com você, o Enzo e o Chris, o caminho fica mais leve e feliz;

À minha orientadora Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues, por ter me aceitado e acolhido em seu grupo de pesquisa, por ser paciente e compreensiva e por todo o conhecimento compartilhado.

À minha amiga Bruna, que me acompanhou em praticamente todos os dias no laboratório, pelos experimentos e conhecimentos partilhados, pelas conversas, reflexões, descobertas, parceria, por dividir sua vida comigo e o energético de todo dia e por toda sua ajuda fundamental para a conclusão desse trabalho; sou muito grata por ter conhecido você! Também agradecer ao Dr. Anderson Camargo, que foi um mentor para mim, me ensinou muito sobre pesquisa, por me inspirar, me ajudar e prestar seu auxílio em todas as etapas vividas com seu jeito único de ser. Não vou me esquecer de vocês;

Aos meus amigos Patricia e Welington, Silvane e Deivid, e tantos outros que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, sempre com palavras de esperança, coragem e carinho;

À equipe do Laboratório de Neurobiologia da Depressão, Ana Paula, Eloise, Morgana pelo apoio e pelas contribuições durante esse período e também à Daiane Fraga, pelo auxílio dos experimentos. Bem como, gostaria de agradecer aos colegas do Laboratório de Neurociência Translacional, à professora Manuella Kaster por sua ajuda em diversos momentos e à Nicolle, por toda a doçura, por toda a ajuda técnica e apoio emocional na realização dos trabalhos;

Agradeço a todos os professores e aos colegas que pude conhecer nesse período do mestrado, foi um imenso prazer conhecê-los;

À todos aqueles que participaram direta ou indiretamente e contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado;

Ao LAMEB pela estrutura e uso dos equipamentos;

À CAPES e a UFSC pelo apoio financeiro e pela infraestrutura.

Muito obrigada!

*Livros não mudam o mundo, quem muda o mundo são as pessoas.  
Os livros só mudam as pessoas.  
(Mário Quintana)*



## RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um transtorno psiquiátrico muito prevalente em todo o mundo que possui origem multifatorial, dentre eles a neuroinflamação. A busca pela associação de compostos que possam proporcionar um efeito antidepressivo sinérgico se constituiu em uma estratégia terapêutica para o TDM. A vitamina D (colecalfiferol) é um hormônio que possui diversas funções regulatórias, com uma ampla quantidade de receptores no cérebro. Já a curcumina é um polifenol que possui, assim como a vitamina D, propriedades anti-inflamatórias, neuromoduladoras e neuroprotetoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação de colecalfiferol e curcumina em um modelo animal de depressão induzido por lipopolissacarídeo (LPS) e investigar se a administração de colecalfiferol e/ou curcumina é capaz de prevenir as alterações neuroinflamatórias causadas pela administração do LPS no córtex pré-frontal de camundongos *Swiss* fêmeas. Observou-se nesse trabalho que a administração de curcumina (40 mg/kg) e/ou colecalfiferol (100 UI/kg) 7 dias antes da administração de LPS (0,5 mg/kg, i.p.) foi capaz de prevenir o comportamento tipo depressivo induzido por este desafio inflamatório no teste de suspensão pela cauda em camundongos *Swiss* fêmeas, indicando um efeito do tipo antidepressivo dos compostos. Embora o efeito tenha ocorrido no grupo que recebeu a associação de curcumina e colecalfiferol, o efeito não foi sinérgico entre os compostos. No teste de campo aberto, avaliou-se a atividade locomotora dos animais e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na distância total percorrida. Nesse teste foram avaliados o tempo no centro e parâmetros relacionados ao comportamento de autolimpeza. Evidenciou-se que os grupos tratados com LPS apresentaram redução no tempo no centro e aumento no tempo total de autolimpeza avaliado no campo aberto comparado ao grupo controle, indicando um comportamento do tipo ansioso dos animais. Os tratamentos com curcumina e /ou colecalfiferol não preveniram esse efeito do LPS no comportamento tipo ansioso. A avaliação do estado físico do pelo dos camundongos mostrou que apenas o grupo desafiado com LPS, apresentou uma piora no estado do pelo. Ao avaliar os mecanismos moleculares envolvidos, evidenciou-se nesse trabalho que o LPS aumentou o imunocontéudo da proteína adaptadora ASC (*Adaptor apoptosis associated speck-like protein containing a CARD*), caspase-1, Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no córtex pré-frontal dos camundongos. A curcumina e o colecalfiferol não preveniram o aumento dessas proteínas no córtex pré-frontal dos camundongos, indicando que o efeito do tipo antidepressivo observado no teste de suspensão pela cauda possa ocorrer por outro mecanismo independente de um efeito anti-inflamatório no córtex pré-frontal.

**Palavras-chave:** Curcumina; lipopolissacarídeo; neuroinflamação; transtorno depressivo maior; vitamina D.



## ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is a highly prevalent psychiatric disorder that has a multifactorial origin, as the neuroinflammation. The search for the association of compounds that can provide a synergistic antidepressant effect has become a therapeutic strategy for MDD. Vitamin D (cholecalciferol) is a hormone that has several regulatory functions, with a large number of receptors in the brain. Curcumin is a polyphenol that, like vitamin D, has anti-inflammatory, neuromodulatory, and neuroprotective properties. The aim of this study was to evaluate the effect of the association of cholecalciferol and curcumin in an animal model of depression induced by lipopolysaccharide (LPS) and to investigate whether the administration of cholecalciferol and/or curcumin is able to prevent the neuroinflammatory changes caused by LPS administration in the pre frontal cortex to female Swiss mice. Curcumin (40 mg/kg) and/or cholecalciferol (100 IU/kg) administered 7 days before LPS administration (0.5 mg/kg, i.p.) was able to prevent the LPS-induced depressive-like behavior in the tail suspension test in female Swiss mice, suggesting an antidepressant-like effect of the compounds. Although the effect occurred in the group that received the association of curcumin and cholecalciferol, the effect was not synergistic. In the open field test, no significant differences in the locomotor activity were observed in the total distance traveled in any group. Also, the LPS-treated groups showed a reduction in the time spent in the center of the apparatus and an increase in the total time of grooming in the open field compared to the control group, indicating an anxiety-like behavior of the animals. Curcumin and/or cholecalciferol treatments did not prevent this effect of LPS. Evaluation of the coat state score of mice showed that only the group challenged with LPS had a poor coat condition, suggesting a low self-care behavior. Western blotting analyses showed that LPS increased the immunoccontent of Adaptor *apoptosis associated speck-like protein containing a CARD* (ASC), caspase-1, interleukin-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), thioredoxin interaction protein (TXNIP) and induced nitric oxide synthase (iNOS) in the prefrontal cortex of mice, but this effect was not prevented by curcumin and/or cholecalciferol. This result suggests that the antidepressant-like effect of curcumin and cholecalciferol in LPS-challenged mice may occur by mechanisms independent on an anti-inflammatory effect in the prefrontal cortex.

**Keywords:** Curcumin; lipopolysaccharide; major depressive disorder; neuroinflammation; vitamin D.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Critérios diagnósticos da depressão, de acordo com o DSM-5 .....	24
Figura 2 - Teoria Monoaminérgica da depressão .....	26
Figura 3 - Eixo HHA .....	29
Figura 4 - Ativação do Inflamassoma NLRP3 .....	33
Figura 5 - Estrutura do LPS .....	34
Figura 6 - Metabolismo e síntese da vitamina D .....	38
Figura 7 - Estrutura química dos curcuminoides da <i>Curcuma longa</i> .....	42
Figura 8 - Metabólitos da curcumina em diferentes vias de administração .....	43
Figura 9 - Protocolo experimental para avaliação do efeito tipo antidepressivo do colecalciferol e da curcumina quando submetidos aos testes comportamentais .....	51
Figura 10 - Efeito da pré-administração por 7 dias de curcumina e colecalciferol em camundongos desafiados com LPS e submetidos ao teste de suspensão pela cauda e ao teste de campo aberto.....	57
Figura 11 - Efeito do colecalciferol e/ou curcumina em camundongos desafiados com LPS nos parâmetros relacionados ao comportamento do tipo ansioso nas análises do comportamento de autolimpeza e do campo aberto .....	60
Figura 12 – Imagens representativas dos grupos experimentais na Análise da qualidade do pelo .....	62
Figura 13 - Efeito da administração de colecalciferol e/ou curcumina após o desafio com LPS ou salina no imunoconteúdo das proteínas NLRP3, ASC, TXNIP, Caspase-1 e IL-1 $\beta$ no córtex pré-frontal de camundongos .....	64
Figura 14 - Efeito da administração de colecalciferol e/ou curcumina após o desafio com LPS ou salina no imunoconteúdo de iNOS no córtex pré-frontal de camundongos .....	65

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Escore para Avaliação do Estado Físico do Pelo dos Animais .....	54
Tabela 2 – Resultados da Avaliação pelo escore do estado físico do pelo dos animais.....	61



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HT1A	Autorreceptor de Serotonina do tipo 1 <sup>a</sup>
ASC	<i>Adaptor apoptosis associated speck-like protein Containing a CARD</i>
AVP	Arginina vasopressina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
BHE	Barreira hematoencefálica
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CYP27B1	Enzima 25-hidroxitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilase
CYP2R1	Vitamina D-25-hidroxilase
DAMP	Padrões Moleculares Associados à Perigos ou Danos
DBP	Proteína de ligação à vitamina D
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IBA-1	Molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio-1
IL-18	Interleucina 18
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
iMAO	Inibidores de Monoamina Oxidase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISRN	Inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptção de Serotonina
MAO	Monoamina oxidase
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear <i>kappa B</i>
NLRP3	Família de receptores do tipo NOD contendo o domínio <i>pirina 3</i>
<i>NLRs</i>	<i>NOD-like receptor</i> (receptor do tipo NOD)
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<i>PPRs</i>	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (receptores de reconhecimento de padrões)

RG	Receptores de glicocorticoide
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
TDM	Transtorno Depressivo Maior
<i>TLRs</i>	<i>Toll-like receptor</i> (receptor do tipo toll)
TRX	Tioredoxina oxidoredutase
TXNIP	Proteína de interação com a tioredoxina
VDR	Receptores de Vitamina D

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1	TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	23
1.2	INFLAMAÇÃO E DEPRESSÃO .....	27
1.3	MODELO DE INFLAMAÇÃO POR LIPOPOLISSACARÍDEO.....	34
1.4	TRATAMENTOS ALTERNATIVOS .....	35
<b>1.4.1</b>	<b>Vitamina D.....</b>	<b>36</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Curcumina.....</b>	<b>42</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Associação dos compostos .....</b>	<b>45</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
4.1	ANIMAIS .....	50
4.2	COMPOSTOS NUTRACÊUTICOS E TRATAMENTO .....	50
4.3	TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA .....	52
4.4	TESTE DO CAMPO ABERTO .....	52
4.5	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA .....	53
4.6	ESCORE PARA AVALIAÇÃO DO ESTADO FÍSICO DO PELO.....	53
4.7	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	54
4.8	DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	55
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
5.1	EFEITO DO COLECALCIFEROL E/OU CURCUMINA EM CAMUNDONGOS APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA E NA LOCOMOÇÃO AVALIADA NO TESTE DE CAMPO ABERTO .....	56

5.2	EFEITO DO COLECALCIFEROL D E/OU CURCUMINA EM CAMUNDONGOS APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NOS PARÂMETROS RELACIONADOS AO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO NAS ANÁLISES DO COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA E DO CAMPO ABERTO ....	58
5.3	EFEITO DO COLECALCIFEROL E/OU CURCUMINA EM CAMUNDONGOS APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NA AVALIAÇÃO DO ESTADO FÍSICO DO PELO DOS ANIMAIS.....	61
5.4	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE COLECALCIFEROL E/OU CURCUMINA APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NO IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A VIAS INFLAMATÓRIAS .....	63
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) (que será tratado nesse trabalho como depressão) é um dos transtornos psiquiátricos mais incapacitantes, severos e prevalentes em todo o mundo e que pode causar comprometimento na qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares. É relatado que a depressão aumenta o risco de suicídio entre os pacientes acometidos e afeta mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. O Brasil é considerado o segundo país com maior número de casos nas Américas, com 5,8% da população acometida, atrás dos Estados Unidos que possui 5,9%. Além disso, o Brasil é o país com maior prevalência de ansiedade no mundo, cerca de 9,3% da população do país. É demonstrado que o TDM é duas vezes mais frequente em mulheres do que em homens (CULPEPPER; LAM; MCINTYRE, 2017; ISOMETSA, 2014; LI et al., 2021; OTTE et al., 2016; SEEDAT et al., 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). O TDM é caracterizado por prejuízos afetivos, cognitivos e fisiológicos, que podem afetar de forma grave o bem-estar dos indivíduos que são acometidos (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015; ROISER; ELLIOTT; SAHAKIAN, 2011).

De acordo com o DSM-5, do ponto de vista sintomatológico, um indivíduo com depressão deve apresentar pelo menos cinco dos sintomas (figura 1), quase que diariamente, em um período mínimo de duas semanas: a) presença de humor deprimido ou anedonia; b) perda ou ganho de peso significativo; c) insônia ou hipersonia; d) agitação ou lentidão psicomotora; e) fadiga ou perda de energia; f) sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva; g) capacidade reduzida para concentrar-se e pensar; h) pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida sem um plano; i) tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio. O diagnóstico ocorre pela observação clínica dos sintomas, pelos critérios estabelecidos pela Associação Americana de Psiquiatria (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2015).

Figura 1 - Critérios diagnósticos da depressão, de acordo com o DSM-5



O paciente para receber o diagnóstico de depressão deve apresentar pelo menos cinco dos sintomas acima, por um período mínimo de duas semanas e o primeiro sintoma apresentado (humor deprimido ou anedonia) deve estar obrigatoriamente presente. Fonte: a autora, 2022; adaptado de (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2015).

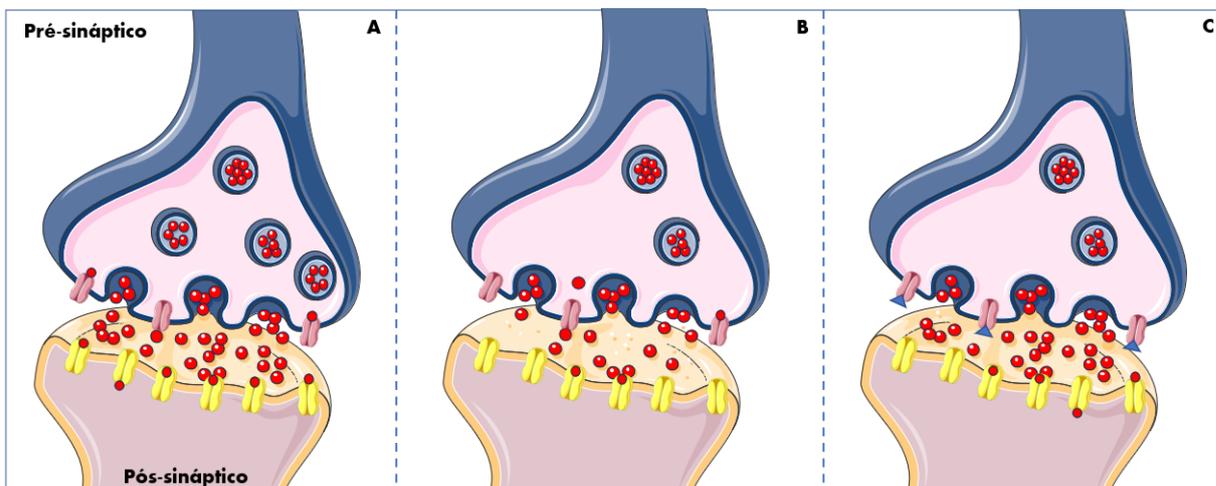
Os transtornos psiquiátricos, como a depressão, possuem origem multifatorial, envolvendo a disfunção de diferentes áreas do cérebro como córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens e diferentes tipos de células, como neurônios, astrócitos e micróglia e podem compreender alterações em funções bioquímicas, como na expressão gênica e na resposta imune (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Além do exposto, a depressão pode apresentar comorbidades com outras doenças, tais como doenças cardiovasculares, neurológicas e câncer (NESTLER et al., 2002). No que diz respeito às comorbidades, sabe-se que a depressão pode coexistir com os transtornos de ansiedade, sendo a comorbidade ansiedade/depressão apresentando uma ocorrência maior em conjunto do que isoladas (BAKISH, 1999; STEIN et al., 2001). Destaca-se que cerca de 85% dos pacientes com diagnóstico de depressão apresentam algum tipo de transtorno de ansiedade, além de preceder o início do primeiro episódio depressivo em cerca de 30% dos pacientes, enquanto a depressão ocorre em 90% dos pacientes que apresentam ansiedade (FAVA et al., 2000, 2004; GORMAN, 1996). Ansiedade e depressão, quando combinadas, além de ser mais incapacitantes, podem desencadear formas severas de cada transtorno, além de aumentar o risco de suicídio. Como

consequência, podem ser mais resistentes ao tratamento e resultar em um agravamento das condições físicas, sociais e mais deficiências psicológicas do que cada transtorno sozinho (TILLER, 2012).

Apesar de prevalente, a depressão ainda não possui seus mecanismos biológicos totalmente definidos e em vista desse fato, existem diversas hipóteses que tentam explicar, pelo menos em parte, a etiologia deste transtorno. A primeira teoria bem articulada para elucidar os mecanismos neurobiológicos da depressão foi a teoria monoaminérgica, apresentada no início dos anos 60. Postula que a origem da depressão pode ser consequência da redução dos níveis de monoaminas na fenda sináptica (SCHILDKRAUT, 1965). Como reforço dessa teoria, foi descoberto um fármaco com a capacidade de provocar a depleção das monoaminas, a reserpina, capaz de aumentar os sintomas relacionados à depressão (FREIS, 1954). Mais tarde Krakowski em 1962 demonstrou que a imipramina, fármaco tricíclico que inibe a recaptação da serotonina e norepinefrina, tinha a capacidade de melhorar os sintomas depressivos (KRAKOWSKI, 1962). Na sequência, foram descobertos outros antidepressivos tricíclicos e os inibidores de monoamina oxidase (iMAO) (OTTE et al., 2016), apoiando a teoria. Somando-se ao fato de que, mais tarde, foram encontrados níveis plasmáticos de serotonina diminuídos em pacientes com depressão (COPPEN; DOOGAN, 1988). Tomados em conjunto, os fatos apresentados fortaleceram a teoria monoaminérgica.

A teoria monoaminérgica postula (figura 2) que, em indivíduos saudáveis, os neurotransmissores monoaminérgicos são liberados para a fenda sináptica e ligam-se em receptores dos neurônios pós-sinápticos. Após essa liberação, as monoaminas são eliminadas da fenda sináptica por recaptação para os neurônios pré-sinápticos, onde podem sofrer degradação enzimática pela enzima monoamina oxidase (MAO). Em indivíduos que possuem depressão, haveria uma diminuição da quantidade de monoaminas na fenda sináptica ou um prejuízo na funcionalidade dos receptores monoaminérgicos, o que explicaria o aparecimento dos sintomas depressivos. Os pacientes submetidos ao tratamento com antidepressivos apresentariam níveis normais de monoaminas na fenda sináptica, o que levaria à remissão dos sintomas depressivos (CASTRÉN, 2005; OTTE et al., 2016).

Figura 2 - Teoria Monoaminérgica da depressão



A teoria monoaminérgica da depressão, elucida que (a) em condições normais as monoaminas (em vermelho) são liberadas do neurônio pré-sináptico e podem interagir com receptores pós-sinápticos e posteriormente podem ser recaptadas pelos neurônios pré-sinápticos. (b) Em um estado de depressão, há uma diminuição da concentração de monoaminas na fenda sináptica, desencadeando a depressão. (c) Em uma situação de tratamento, o bloqueio da recaptação aumenta os níveis de monoaminas disponíveis para interagir com os receptores presentes no neurônio pós-sináptico, com uma reversão do quadro de depressão. Fonte: a autora, 2022.

Considerando o fato de que os fármacos monoaminérgicos restabelecem poucas horas após a administração os níveis de monoaminas na fenda sináptica e que, no entanto, a resposta terapêutica ocorre após várias semanas do tratamento, a teoria monoaminérgica é considerada uma teoria simplista, pois não consegue elucidar os mecanismos envolvidos no efeito tardio dos antidepressivos e a probabilidade de uma interação com diferentes sistemas que realizam neurotransmissão (OTTE et al., 2016).

Para elucidar os sistemas envolvidos nos efeitos tardios, Fischer e colaboradores (2015) postularam que o glutamato co-liberado com serotonina em neurônios da rafe poderia exercer um papel importante no mecanismo de ação dos fármacos antidepressivos. A administração aguda de ISRS rapidamente é capaz de aumentar os níveis extracelulares de serotonina na fenda sináptica, ativando por sua vez os autorreceptores de serotonina do tipo 1A (5HT1A). Esses receptores diminuem as taxas de disparo e exercem efeito inibitório no neurônio pré-sináptico, evento que promove menor liberação de glutamato e de serotonina. O tratamento com ISRS após 2 a 3 semanas, período necessário para a dessensibilização dos autorreceptores, restauram as taxas de disparo, bem como o componente glutamatérgico. O período para que os níveis sinápticos adequados de glutamato sejam reestabelecidos corrobora com a janela de atraso no efeito dos antidepressivos, o que explicaria, em parte, o atraso no efeito terapêutico dos ISRS (FISCHER et al., 2015). Embora os antidepressivos atuais levem

de semanas a meses para promover uma resposta terapêutica, existe uma porcentagem significativa de pacientes que não atinge a remissão completa dos sintomas, mesmo após o tratamento com diversos antidepressivos (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015), o que sugere que existem outros mecanismos que podem estar associados à etiologia da depressão.

## 1.2 INFLAMAÇÃO E DEPRESSÃO

Os mecanismos envolvidos na neuroinflamação e estresse oxidativo têm sido relacionados à depressão e suas comorbidades. O primeiro episódio de depressão do indivíduo pode ocorrer devido a um estresse psicossocial e esses episódios podem ser mais frequentes de acordo com os estressores aos quais o indivíduo pode ser exposto (MARTIN-SUBERO et al., 2015; TROUBAT et al., 2021). O papel das citocinas na depressão foi proposto pela primeira vez por Smith em 1991, que postulou que as citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos poderiam ser um dos mecanismos envolvidos no TDM (SMITH, 1991).

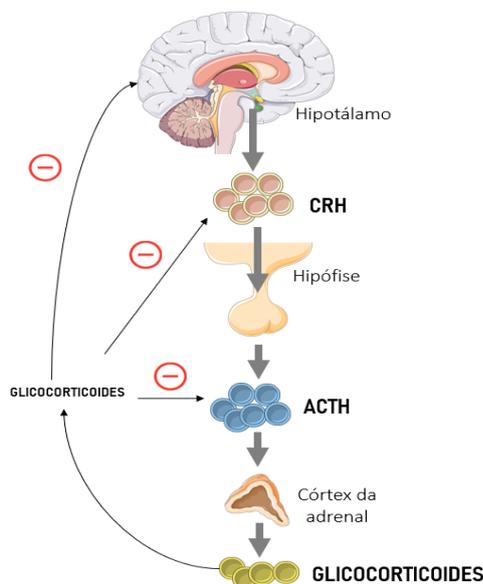
A imunidade é considerada uma linha de defesa e com o passar do tempo, os mamíferos desenvolveram diferentes tipos de sistema de defesa, como as barreiras mecânicas epiteliais ou barreira hematoencefálica (BHE) – esse componente do sistema imune é responsável por uma resposta inflamatória não específica à infecção ou a tecidos, realizando a ativação de células de defesa, que atuarão em diversas vias de sinalização (TROUBAT et al., 2021; TURVEY; BROIDE, 2010; WU; YIN; DU, 2021). O cérebro contém diversas células que apoiam e realizam a resposta imunológica, como oligodendrócitos – atuam no suporte aos neurônios mielinizados, micróglia – considerada células residentes de resposta imunológica inata, astrócitos – envolvidos na regulação de níveis de glutamato e que está intimamente ligada com pericitos, entre outras, que podem adentrar o sistema nervoso central (SNC) em condições patológicas (WU; YIN; DU, 2021). Em uma estimulação externa, como injúria ou inflamação, a micróglia pode adotar morfologias diferentes, deixando sua forma ramificada (responsável pelo monitoramento contínuo para homeostase cerebral) e adotando rapidamente a forma ameboide – que acompanha atividades fagocitárias e liberação de citocinas, processo caracterizado como ativação microglial (JIA et al., 2020; KETTENMANN et al., 2011). A reatividade dessas células auxilia no combate de diversos patógenos invasores, o que caracteriza o fenótipo M2 da micróglia, com seus efeitos que podem ser anti-inflamatórios e protetores.

Em uma ativação sustentada, uma reatividade aumentada pode evocar um processo de neuroinflamação – fato que caracteriza o fenótipo tipo M1, com efeitos pró-inflamatórios, causando danos (RUIZ et al., 2022). As células da microglia, quando ativadas, podem expressar a molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio-1 (IBA-1), utilizada como marcador da condição inflamatória (KETTENMANN et al., 2011). Similar as microglias, astrócitos também podem responder positivamente à neuroinflamação, secretando fatores neurotróficos que facilitam a sobrevivência neuronal e melhoram a matriz extracelular – estado anti-inflamatório (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009) ou quando em ativação sustentada, podem se tornar ativados, sofrendo alterações morfológicas e tornando-se células hipertrofiadas – estado pró-inflamatório. Nesta situação, secretam citocinas pró-inflamatórias, que são relevantes para os neurônios devido à proximidade com terminais sinápticos, o que poderia causar a modificação da excitabilidade, metabolismo neuronal e neurotransmissão (LIDDELOW; BARRES, 2017). Digno de nota, astrócitos quando ativados, podem diminuir a recaptação de glutamato, que impacta negativamente a produção de conexina 43, importante constituinte das junções de fendas da BHE, o que resulta em uma maior permeabilidade da BHE (GIMSA et al., 2013; TROUBAT et al., 2021). As respostas das células de defesa imune podem ser desencadeadas por diversos mecanismos, como mecanismos de respostas a estressores.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) pode estar envolvido no estresse induzido pela ativação microglial, que por consequência estaria relacionada à depressão (ALMEIDA; PINNA; BARROS, 2021; SORRELLS; SAPOLSKY, 2007). A ativação do eixo HHA é positiva, pois faz parte da resposta fisiológica comum, como a preparação para um comportamento de luta e fuga. O mecanismo envolvido no eixo HHA consiste na liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP), que agem no lobo anterior da pituitária e ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Quando liberado na circulação periférica, o ACTH estimula a secreção de epinefrina, norepinefrina e glicocorticoides (cortisol – em humanos e corticosterona – em roedores) pelo córtex adrenal (ALMEIDA; PINNA; BARROS, 2021; PAPADIMITRIOU; PRIFTIS, 2009). No SNC, os glicocorticoides liberados passam a atuar na atividade de *feedback* negativo, através da ativação de receptores de glicocorticoide (RG) no hipocampo, hipotálamo e pituitária anterior. Entretanto, é conhecido que outras regiões encefálicas podem estar envolvidas no feedback negativo, como córtex pré-frontal, tálamo, entre outras (AKANA et al., 2001; BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020; EVANSON et al., 2010). Quando o indivíduo é submetido a um

estímulo estressante – interno ou externo (figura 3), o eixo HHA é ativado e ocorre uma anormalidade nos RG, como diminuição da expressão ou insensibilidade do receptor (inibindo o *feedback negativo*, o desregulando), aumentando a quantidade de glicocorticoides circulantes (JURUENA et al., 2004; KIM et al., 2016; SORRELLS; SAPOLSKY, 2007). Esse aumento dos glicocorticoides podem causar danos neuronais no hipocampo, como prejuízos comportamentais, atrofia hipocampal, prejuízo na retroinibição do eixo HHA, levando a um aumento dos níveis de glicocorticoides de forma sustentada (DUDEK et al., 2019). Foi demonstrado que pode ocorrer uma atrofia de espinhos dendríticos devido ao estresse, o que acarretaria na diminuição do volume do córtex pré-frontal (CHRISTOFFEL; GOLDEN; RUSSO, 2011). O córtex pré-frontal está localizado na porção anterior do córtex cerebral e possui conexão com áreas sensoriais e com o sistema límbico (HIKA; KHALILI, 2021) e é uma estrutura que desempenha um papel importante no controle do humor, na cognição, memória, na organização e no comportamento social (MILLAN; RIVET; GOBERT, 2016). A hiperatividade do eixo HHA decorrente do estresse causa um estado pró-inflamatório central e periférico que se denomina inflamação estéril, por não envolver patógenos nas vias de ativação (CHEN; NUÑEZ, 2010).

Figura 3 - Eixo HHA



Quando o indivíduo é submetido a um estímulo relacionado ao estresse, o eixo HHA é ativado como parte da resposta fisiológica. Uma desregulação do eixo HPA pode ocorrer quando o *feedback negativo* fica prejudicado, culminando em uma maior produção de glicocorticoides, que pode estar relacionado a um estado pró-inflamatório. Fonte: a autora, 2022.

A resposta celular ao estresse inicia por moléculas sinalizadoras, essas que podem ser reconhecidas pelos *pattern recognition receptors* (receptores de reconhecimento de padrões) (PPRs). Os PPRs estão expressos na micróglia, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios e podem ser receptores de membrana, como os receptores do tipo *toll-like* (TLRs) ou como receptores citosólicos *NOD-like* (receptores tipo NOD) (NLRs) (CHEN; NUÑEZ, 2010; KAUFMANN et al., 2017). Esses receptores agem no reconhecimento de moléculas estranhas, que podem ser os Padrões Moleculares Associados a Perigos ou Danos (DAMPs), podem ser endógenas ou também os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), moléculas exógenas.

Existem diversos tipos de inflamassomas, que podem responder à diferentes estímulos de DAMPs e PAMPs, culminando na ativação desse complexo. Os inflamassomas contém três componentes principais: um receptor PPR, uma enzima caspase-1 e uma proteína adaptadora ASC (*Adaptor apoptosis associated speck-like protein Containing a CARD*) – responsável pela interação entre PPR e a caspase-1. Em especial, a estrutura do NLRP3 contém: um domínio repetido que é rico em leucina (LRR) carboxi-terminal; um domínio de nucleotídeo central, que é denominado NATCH e um domínio de pirina (PYD), que funciona como um domínio de recrutamento de caspase (CARD) (WALSH; MURUVE; POWER, 2014). Entre os diversos tipos de inflamassoma que existem, a ativação da família de receptores do tipo NOD contendo o domínio *pirina 3* (NLRP3), está sendo o mais relacionado com a depressão (IWATA; OTA; DUMAN, 2013; KAUFMANN et al., 2017; MORETTI; MAGARIAN BLANDER, 2020; WONG et al., 2016).

A ativação do complexo NLRP3 ocorre em consequência de uma ampla variedade de estímulos e requer dois sinais (figura 4). O primeiro sinal envolve a via TLR, que está presente na membrana plasmática e endossomal, podendo assim ser capaz de detectar DAMPs ou PAMPs (LAMKANFI; DIXIT, 2012). Este sinal induz uma sinalização intracelular que leva ao recrutamento da proteína adaptadora de diferenciação da resposta primária mieloide 88 – MyD88 (do inglês, *Myeloid Differentiation primary response 88*), que é responsável por recrutar e ativar fatores que levam a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a transcrição de genes, como as formas imaturas de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-18 (IL-18) e de NLRP3 (FITZGERALD et al., 2009; RUIZ et al., 2022). O segundo sinal é necessário para que o inflamassoma se forme e seja um oligômero definido, que recrutará a

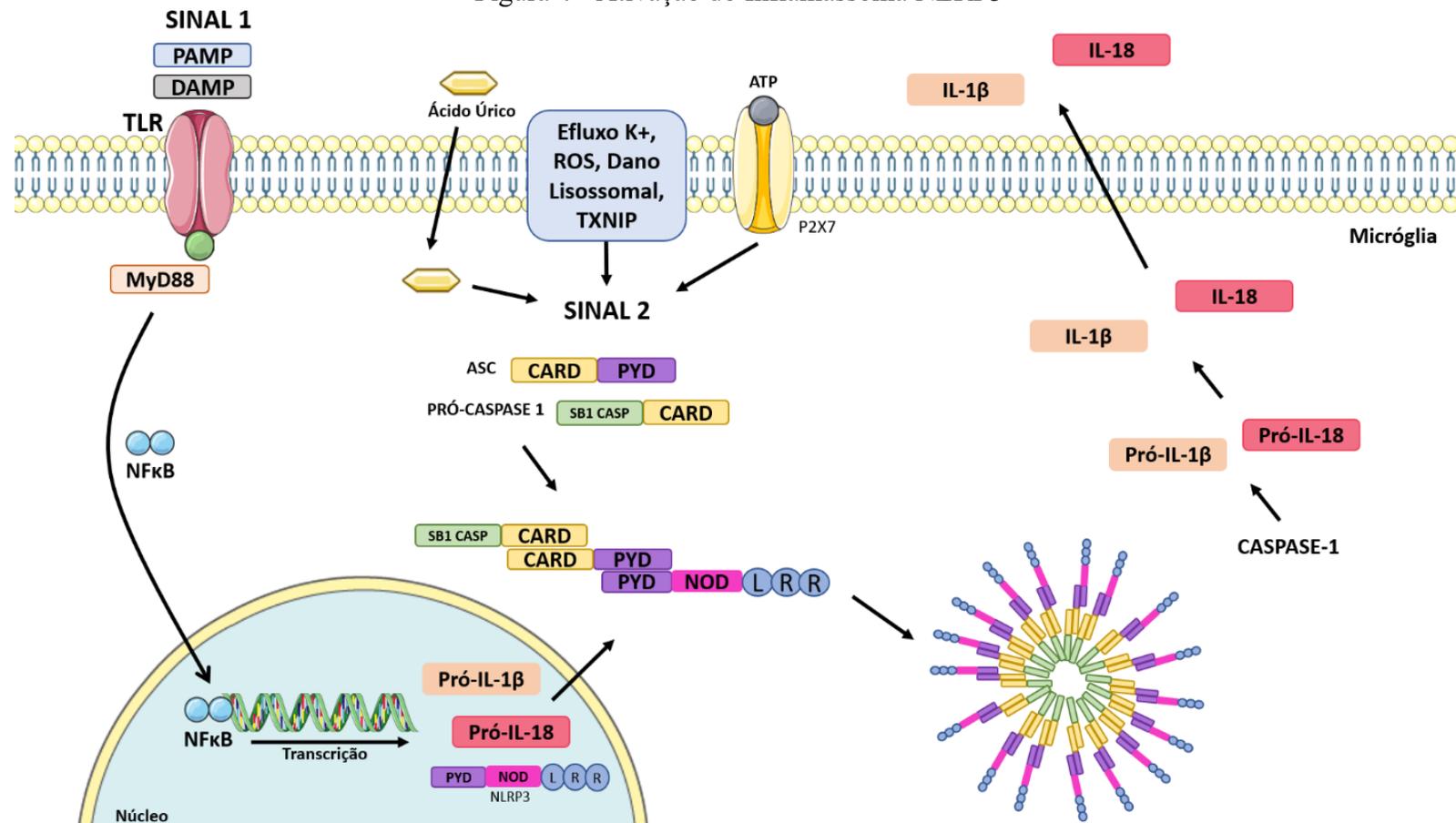
proteína adaptadora ASC, que com o seu domínio CARD, recrutará uma procaspase-1, que será ativada via auto-proteólise se tornando caspase-1, sendo esse complexo formado chamado de inflamassoma (LAMKANFI; DIXIT, 2014). Portanto, o inflamassoma montado com a caspase-1 ativada é capaz de converter pró-IL-18 e pró-IL1 $\beta$  em suas formas ativas, IL-18 e IL-1 $\beta$ , respectivamente, desencadeando a resposta inflamatória (FLESHNER; FRANK; MAIER, 2017; SINGHAL et al., 2014).

É possível também que ativação do inflamassoma ocorra por sinais como ATP, efluxo de potássio (K<sup>+</sup>), peptídeo  $\beta$ -amiloide, cristais de ácido úrico, espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), excesso de glicocorticoides (ELLIOTT, 2015; KELLEY et al., 2019; MORETTI; BLANDER, 2020). A geração de ROS é bem caracterizada na ativação do inflamassoma e existem outros mecanismos que estão relacionados à produção de ROS, como o mecanismo envolvido com a proteína de interação com a tioredoxina (TXNIP). A TXNIP é um elemento constitutivamente ligado à enzima antioxidante tioredoxina oxidoredutase (TRX) e é considerado um regulador negativo da atividade redutase dessa proteína. Em altas concentrações de ROS, TXNIP pode dissociar-se do TRX, deixando-o livre para se ligar à região LRR de NLRP3, bem como seu domínio NACHT, ativando o inflamassoma e iniciando assim uma resposta inflamatória (ISMAEL et al., 2021; TSUBAKI; TOOYAMA; WALKER, 2020; ZHANG et al., 2021). Inversamente, inibidores de ROS bloqueiam a ativação do inflamassoma (ZHOU et al., 2009).

Tem sido demonstrado que a desregulação da via do óxido nítrico (NO) está envolvida na fisiopatologia de diversas patologias, inclusive na depressão. Altas concentração de NO podem elevar a produção de RNS e de ROS e por consequência a de citocinas pró-inflamatórias, culminando em neurotoxicidade (DOWLATI et al., 2010). O NO é sintetizado a partir de L-arginina por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase: óxido nítrico sintase neuronais (tipo 1), Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (tipo 2), que tem sua produção induzida e aumentada na inflamação por citocinas ou outros mediadores; ou óxido nítrico sintase endotelial (tipo 3) (DHIR; KULKARNI, 2011). A enzima iNOS é expressa em diversos tipos de células, incluindo macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. A expressão de iNOS também envolve vias de transdução de sinais, como a via do NF- $\kappa$ B e essa expressão pode ser desencadeada por citocinas pró-inflamatórias, assim como pelo lipopolissacarídeo (HEBA et al., 2001).

Em um quadro de inflamação, o LPS ou citocinas pró-inflamatórias induzem a síntese de iNOS, culminando no aumento da produção de NO que, em altos níveis pode reagir com moléculas do tipo superóxido, gerando peroxinitrito e aumentando a toxicidade celular (ABDEL-ZAHER et al., 2017; BEHESHTI et al., 2020; FORSTERMANN et al., 1994). O aumento de NO pelo LPS é um dos principais fatores de risco para a ativação microglial, pois a iNOS por ser responsável pela produção de NO que está amplamente envolvida na neuroinflamação (ZHANG et al., 2012a). Ao contrário do exposto, na presença de inibidores de iNOS a produção de NO e citocinas é atenuada (ANAEIGOUDARI et al., 2016).

Figura 4 - Ativação do Inflamassoma NLRP3

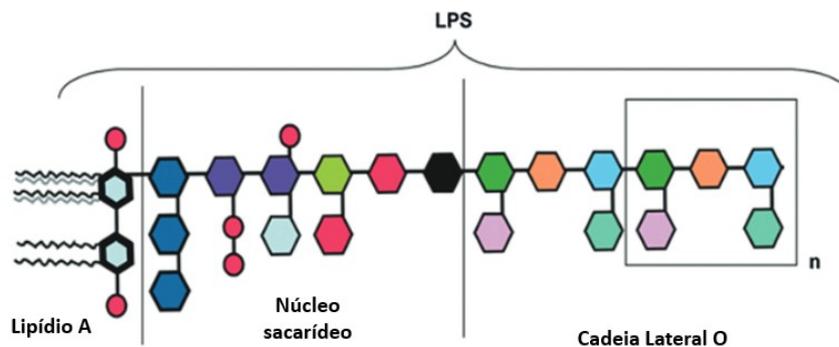


A ativação do inflamassoma NLRP3 é realizada através de 2 sinais. O primeiro é a ligação de DAMPs ou PAMPs no receptor TLR, que recruta MyD88, ativando a cascata de sinalização que envolve NF- $\kappa$ B, iniciando a transcrição de proteínas: pró-IL1 $\beta$ , Pró-IL18 e a proteína NLRP3. O segundo sinal ocorre quando as proteínas sintetizadas no núcleo são enviadas ao citosol, onde recrutam outras proteínas, como ASC através do domínio de pirina e a pró-caspase 1 através do domínio de recrutamento de caspase (CARD). Essa junção se repete e favorece a montagem do inflamassoma NLRP3, que ativará a forma ativa de caspase-1 por clivagem proteolítica, proporcionando a formação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 a partir de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, respectivamente. Fonte: a autora, 2022.

### 1.3 MODELO DE INFLAMAÇÃO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

O lipopolissacarídeo (LPS), considerado uma endotoxina, é um dos principais glicolipídios da superfície da membrana externa de bactérias gram-negativas e sua principal função é estrutural, enquanto responsável por manifestações tóxicas no hospedeiro, bem como pela inflamação sistêmica (DIKS; VAN DEVENTER; PEPPELENBOSCH, 2001). É composto por três estruturas: um lipídio A – responsável pela maior parte das respostas imunológicas, o núcleo sacarídeo e a cadeia lateral O (figura 5) (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Figura 5 - Estrutura do LPS



O LPS é composto por 3 estruturas, a estrutura lipídica A, o núcleo sacarídeo e a cadeia lateral O. Essa estrutura se repete diversas vezes e é o componente externo da membrana de bactérias gram negativas. Fonte: SILIPO et al., 2010.

O LPS causa alterações comportamentais transitórias de cunho neuroinflamatório, chamadas de comportamento associado à doença (*sickness behavior*), que são fundamentais para resposta de recuperação do organismo quando ocorre a ativação do sistema imune (DANTZER, 2009). O pico de efeitos do LPS se dá cerca de 2 horas após a sua administração, induzindo respostas como febre, redução da locomoção, entre outros; enquanto o comportamento tipo-depressivo é observado 24 horas após a administração (LOPES, 2016; ZHAO et al., 2019c). Portanto, a administração sistêmica de LPS é bem caracterizada por induzir um comportamento do tipo-depressivo e neuroinflamação (LOPES, 2016; O'CONNOR et al., 2009; PANDUR et al., 2018). O comportamento do tipo-depressivo causado pelo LPS em camundongos se caracteriza pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado (SU et al., 2020) e no teste de suspensão pela cauda (QIU et al., 2020) e comportamento anedônico no teste de preferência a sacarose, ao diminuir a preferência por sacarose dos camundongos nesse teste (BIESMANS et al., 2016).

Além de alterações comportamentais, o LPS pode também promover alterações moleculares que culmina com a resposta inflamatória, desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativando o inflamassoma NLRP3 (ZHU et al., 2017) e expressão de IBA-1 (ZHENG et al., 2021). Desta forma, o LPS desempenha um papel importante na estimulação do sistema imunológico, atuando como um PAMP. Essa endotoxina pode ser reconhecida pelos receptores TLR que ativam vias de sinalização e a ativação de caspase-1, a maturação e liberação de citocinas pró-inflamatórias, possibilitando a ativação aguda do sistema imunológico periférico inato, contribuindo para o processo de inflamação, resultando na ativação microglial (MOHAMMAD; THIEMERMANN, 2021; PARK; LEE, 2013).

#### 1.4 TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Os fármacos que interagem com o sistema monoaminérgico são os de referência para o tratamento da depressão, sendo utilizados como a primeira linha de tratamento. Entretanto, apesar de todo o desenvolvimento dos fármacos antidepressivos e a ampla utilização clínica, eles apresentam limitações, como: efetividade baixa – aproximadamente 50% dos pacientes não responderem adequadamente ao tratamento; demora na resposta terapêutica – tempo de resposta igual ou superior a 4 semanas) e alto índice de refratariedade em cerca de 30% dos pacientes. Além do exposto, os fármacos podem apresentar efeitos adversos, corroborando para a menor adesão ao tratamento (BERTON; NESTLER, 2006; CASTRÉN, 2005; IONESCU; PAPAKOSTAS, 2017; NUÑEZ et al., 2022; PEREZ-CABALLERO et al., 2019).

Considerando o exposto, existe uma busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento da depressão. O interesse por compostos naturais para o combate de diversos transtornos é considerado como um novo campo a ser explorado. Nesse sentido, a busca por propriedades que sejam relevantes é acentuada (YUAN et al., 2016). Os tratamentos alternativos com a utilização de compostos naturais como minerais, hormônios e nutracêuticos poderiam potencializar a resposta aos tratamentos convencionais (DOME et al., 2019).

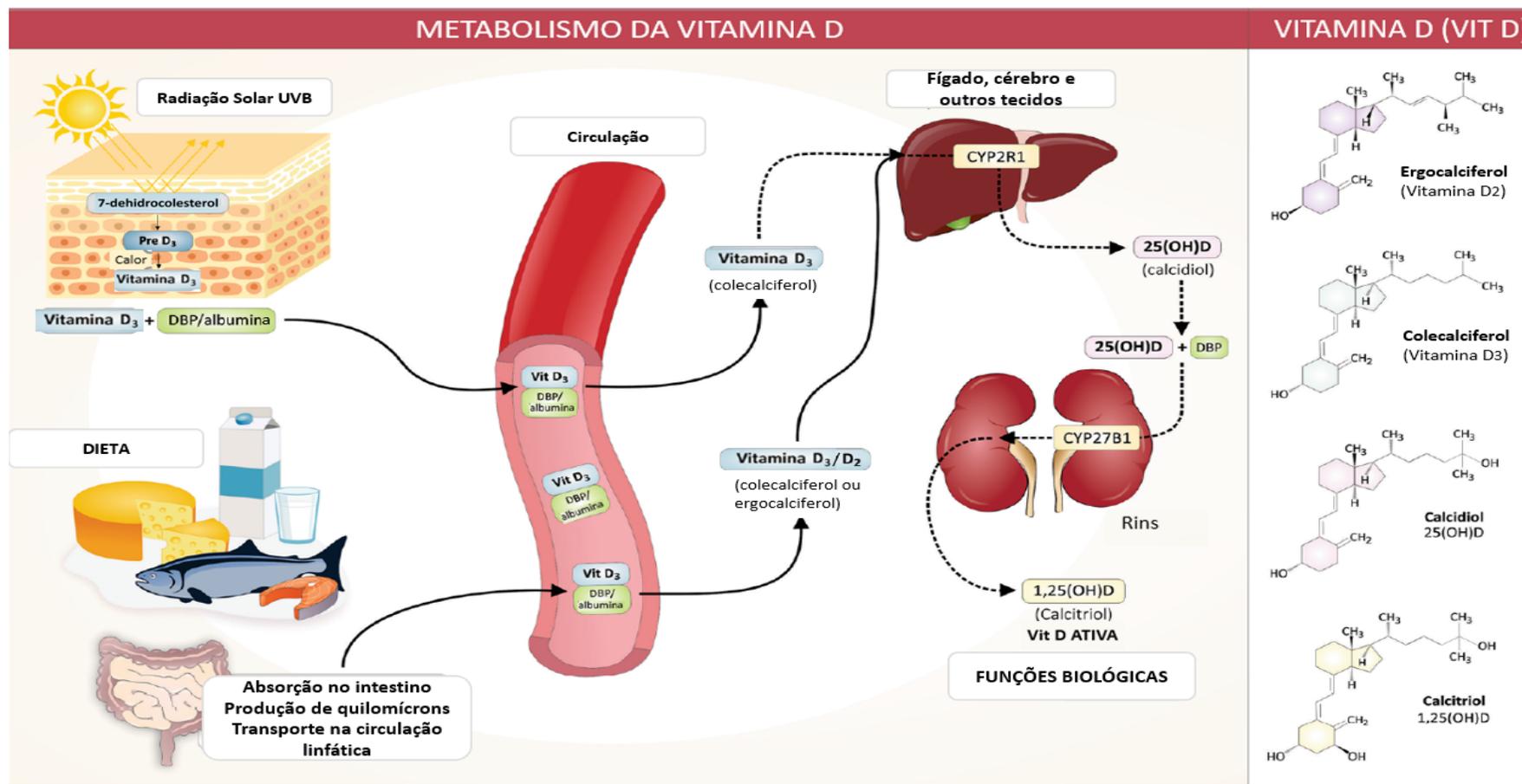
### 1.4.1 Vitamina D

A vitamina D é um hormônio e nutriente que pode ser obtido pela dieta – na forma de ergocalciferol, também chamado de vitamina D<sub>2</sub> ou através do consumo de alimentos de origem animal e vegetal – na forma de colecalciferol, também chamado de vitamina D<sub>3</sub>, tais como peixes de água salgada, leite e ovos ou cogumelos. No entanto, a principal produção de colecalciferol ocorre na epiderme por ação dos raios UVB sobre o 7-desidrocolesterol. Desta forma, a vitamina D pode ser produzida de forma endógena – cerca de 80%, através de uma reação com raios ultravioleta, dentro do intervalo de 290 a 315 nm. A irradiação solar é importante, pois é responsável pela transformação espontânea de 7-desidrocolesterol presente na epiderme em pré-vitamina D. Essa sofre isomerização térmica e é convertida em vitamina D<sub>3</sub> – Colecalciferol (CHANG; LEE, 2019). Fatores como época do ano, intensidade de irradiação solar, latitude, quantidade de melanina e frequência do uso de filtros solares impactam a produção endógena de vitamina D (TSIARAS; WEINSTOCK, 2011).

Aproximadamente 20% da quantidade necessária de vitamina D é obtida através da dieta, entretanto essas quantidades são insuficientes para manutenção dos níveis normais de vitamina D. Quando há a ingestão pela dieta de fontes de vitamina D, estas são desesterificadas antes da absorção no intestino delgado (HOLLIS et al., 1996). Quanto chega ao estômago, a vitamina D não é sensível ao pH ácido, a liberação da fração da vitamina D é realizada pela pepsina e a lipase gástrica pode hidrolisar os ésteres de vitamina D, tornando-os absorvíveis (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2015; MEZA-MEZA; RUIZ-BALLESTEROS; DE LA CRUZ-MOSSO, 2020). No intestino delgado, ocorre a absorção que desencadeia a liberação de ácidos biliares e lipases, necessários para absorção de gorduras e liberação de ácidos graxos livres, respectivamente. Dentro dos enterócitos, a vitamina D é embalada junto com outros lipídeos e proteínas nos quilomícrons, sendo esse o principal caminho para que a vitamina D chegue à circulação (BOREL; CAILLAUD; CANO, 2015; HOLLIS et al., 1996; JONES, 2008). Após estar em circulação, a vitamina D obtida através da dieta passa pela ativação de sua função biológica de forma semelhante à vitamina D produzida endogenamente. A vitamina D<sub>3</sub> por si só não é uma molécula biologicamente ativa e para alcançar a forma biológica ativa, são envolvidas duas reações de hidroxilação. A vitamina D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> é transportada pelo sangue pela proteína de ligação à vitamina D (DBP) até o fígado, local no qual ocorre a primeira reação de hidroxilação no carbono 25 por ação da enzima vitamina D-25-hidroxilase (CYP2R1), que

produz 25(OH)D3 (calciferol). DBP se liga ao calciferol e esse complexo é transportado aos rins, onde ocorre a segunda reação de hidroxilação no carbono 1 por ação da enzima 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1), obtendo como produto a 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25(OH)2D3) – conhecida como calcitriol, a forma ativa da vitamina D3 que poderá exercer função biológica. O alvo para ligação das formas ativas de vitamina D são os receptores de vitamina D (VDR), que estão espalhados amplamente em diversos tecidos (figura 6) (CASSEB; KASTER; RODRIGUES, 2019; CHAROENNGAM; HOLICK, 2020; CHRISTAKOS et al., 2016; MEZA-MEZA; RUIZ-BALLESTEROS; DE LA CRUZ-MOSSO, 2020; NAIR; MASEEH, 2012).

Figura 6 - Metabolismo e síntese da vitamina D



Metabolismo da vitamina D. A vitamina D pode ser produzida de forma endógena, na pele (vitamina D<sub>3</sub> ou Colecalciferol) ou pode ser obtida através da dieta (vitamina D<sub>2</sub> ou ergocalciferol através de fontes vegetais e D<sub>3</sub> ou colecalciferol de fontes animais). A vitamina D proveniente da dieta é absorvida no intestino delgado e incorporada em quilomícrons, que vão ser carreados através da circulação linfática. Na circulação, a vitamina D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> é transportada por DBP ou pela albumina. É transportada ao fígado, onde ocorre a primeira hidroxilação no carbono 25 pela enzima CYP2R, formando 25(OH)D (calcidiol). Esse metabólito é transportado por DBP para os rins, onde ocorre a segunda hidroxilação, catalisada pela enzima CYP27B1, resultando em 1,25(OH)D (calcitriol), forma ativa da vitamina D, que pode realizar diferentes funções biológicas. Fonte: CASSEB; KASTER; RODRIGUES, 2019.

Do ponto de vista fisiológico, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D atua como um hormônio esteroide clássico (similar aos hormônios sexuais ou da tireoide): depois da ligação da forma biológica ativa nos receptores VDR, esse complexo se transloca para o núcleo da célula e é capaz de regular a expressão de diversos genes que interagem com a vitamina D (TSIARAS; WEINSTOCK, 2011). Por possuir muitos receptores VDR no sistema nervoso, a vitamina D é um alvo interessante para novas pesquisas. Estudos em animais sugerem que alguns metabólitos, entre eles a 25(OH)D<sub>3</sub> pode atravessar a barreira hematoencefálica e atuar como substrato para conversão em 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no cérebro (UPADHYAY, 2014). Existem evidências de que o receptor de vitamina D (VDR) e a enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase que gera a forma ativa de vitamina D<sub>3</sub>, o 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol), estejam presentes no cérebro humano (EYLES et al., 2005). Dessa forma, além de suas propriedades anti-inflamatórias, existe o interesse nos efeitos que a vitamina D pode exercer no cérebro.

A vitamina D pode exercer diversos efeitos biológicos na inflamação e respostas imune (CARLBERG, 2019; MEZA-MEZA; RUIZ-BALLESTEROS; DE LA CRUZ-MOSSO, 2020). Acredita-se que o colecalciferol pode promover efeitos benéficos em relação a diversas condições patológicas, como doenças autoimunes, cardiovasculares, câncer, doença de Alzheimer e demência (CASSEB et al., 2019). A suficiência ou deficiência de vitamina D é determinada pelo nível sérico de 25(OH)D<sub>3</sub> (CHRISTAKOS et al., 2016). A concentração considerada suficiente de vitamina D é quando os níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> são maiores que 30 ng/mL; a concentração de vitamina D é considerada insuficiente quando os níveis estão entre 21 a 29 ng/mL e a deficiência desta vitamina é considerada quando houver uma concentração abaixo de 20 ng/mL de 25(OH)D<sub>3</sub> (HOLICK, 2008). A deficiência de vitamina D é um problema de saúde global, que pode se exacerbar de acordo com os problemas pré-existentes, estilo de vida, uso demasiado de filtros solares e baixa exposição à luz solar (MÁČOVÁ; BIČÍKOVÁ, 2021).

Estudos clínicos têm mostrado evidências sobre a relação da deficiência de vitamina D com a depressão. Em um estudo que examinou a associação de níveis séricos de vitamina D em adultos com 65 anos de idade ou mais em dois períodos de acompanhamento (3 e 6 anos), relatou que indivíduos com níveis baixos de 25(OH)D<sub>3</sub> (<20 ng/mL), apresentaram escores de depressão significativamente mais altos nos períodos tanto em 3 e 6 anos, em comparação aos adultos controle (MILANESCHI et al., 2010). Outro estudo investigou a associação entre os níveis de vitamina D em uma coorte de indivíduos com 15 – 65 anos de idade, dos quais 1102

indivíduos com distúrbios depressivos, 790 em estado de remissão de acordo com o DSM-5 e 495 controles saudáveis. Em comparação com os controles, os pacientes com diagnóstico de depressão apresentaram níveis séricos de 25(OH)D mais baixos, particularmente nos indivíduos com sintomas mais graves. Os autores sugeriram que em pacientes que se apresentavam com distúrbios depressivos, com nível sérico de 25(OH)D mais baixo, poderiam apresentar vulnerabilidade biológica à depressão (MILANESCHI et al., 2014). Uma revisão sistemática que avaliou a depressão e baixos níveis de vitamina D relataram uma associação positiva entre baixos níveis de vitamina D e a depressão. A quantificação dos níveis séricos mais baixos de vitamina D em indivíduos com depressão em comparação com os controles demonstrou que existe uma probabilidade aumentada de quadro depressivo em indivíduos com vitamina D sérica mais baixa, comparados com os que possuem níveis séricos mais altos (ANGLIN et al., 2013). Em um estudo mais recente, Grudet e colaboradores em 2020 evidenciaram uma correlação negativa entre 25(OH)D e marcadores inflamatórios em indivíduos com TDM, mas não em controles, sendo essa correlação ainda maior em pacientes com ideação suicida. Essa descoberta sugere que baixos níveis de vitamina D estão relacionados com um estado pró-inflamatório, frequentemente observado em indivíduos com depressão e suicidas. Esse estudo também especula que uma suplementação com vitamina D poderia atenuar a inflamação dos indivíduos com baixos níveis séricos de vitamina D, uma vez que a inflamação pode ser subjacente à outras comorbidades médicas e pode aumentar a resistência à antidepressivos (GRUDET et al., 2020).

A suplementação de pacientes com diagnóstico de depressão com doses semanais de 50.000 UI por 3 meses (ALGHAMDI et al., 2020) ou 8 semanas (KAVIANI et al., 2020; SEPEHRMANESH et al., 2016) mostrou efeitos benéficos nos índices avaliativos, melhora do humor, nível de vitamina D e sintomas depressivos. Em outro estudo, no qual ocorreu a suplementação com 1.200 UI por 12 meses não foi possível observar efeitos sobre os sintomas depressivos (DE KONING et al., 2019). Um estudo de Khoraminy e colaboradores comparou os efeitos da vitamina D com a fluoxetina. Dois grupos foram estabelecidos, o grupo que recebeu fluoxetina (20 mg) e placebo e um grupo que recebeu fluoxetina (20 mg) e vitamina D (1500 UI) por dia, durante 8 semanas. Os grupos foram avaliados por escalas de depressão e ao final das 8 semanas, os pertencentes ao grupo fluoxetina e vitamina D apresentaram diminuição significativa dos escores de depressão em comparação ao grupo que recebeu somente

fluoxetina, demonstrando o potencial da vitamina D em aumentar a eficácia desse antidepressivo (KHORAMINYA et al., 2012).

Estudos realizados em roedores têm fornecido evidências de efeitos tipo-antidepressivo da vitamina D, evidenciados pela redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, indicando um efeito tipo-antidepressivo, em camundongos (KAWAURA et al., 2017). Em outro estudo no qual a vitamina D foi administrada por 14 dias em ratas ovariectomizadas, foi relatado que o grupo que recebeu vitamina D apresentou diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, o que caracteriza um efeito tipo-antidepressivo (FEDOTOVA et al., 2016). Demonstrou-se que a vitamina D administrada nos últimos 7 dias de um protocolo de estresse crônico imprevisível por 21 dias foi capaz de abolir o comportamento do tipo depressivo e a redução dos níveis de serotonina no córtex pré-frontal em camundongos *Swiss* fêmeas, indicando um comportamento do tipo antidepressivo dependente da biodisponibilidade de serotonina (NEIS et al., 2022).

Estudos realizados em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona por 21 dias mostraram que o colecalciferol administrado nos últimos 7 dias do tratamento com corticosterona apresentou efeito tipo antidepressivo nos testes comportamentais aplicados (CAMARGO et al., 2018; CAMARGO et al., 2020; DA SILVA SOUZA et al., 2020). Após a administração crônica, um estudo de Da Silva Souza e colaboradores em 2020 evidenciou que a menor dose (100 UI/kg) de colecalciferol já desencadeou efeito tipo antidepressivo, que foi comparável com o tratamento controle com fluoxetina, revelando que o colecalciferol poderia ser um potencial antidepressivo (DA SILVA SOUZA et al., 2020). Além do efeito tipo-antidepressivo do colecalciferol evidenciado pelos testes comportamentais, o estudo de Camargo et al. (2018) mostrou através de ensaios bioquímicos que a administração do colecalciferol reduziu o estresse oxidativo. Um estudo mais recente, forneceu evidências de que o efeito tipo antidepressivo do colecalciferol estava associado à redução da expressão de proteínas relacionadas ao inflamassoma NLRP3, como ASC, TXNIP, NLRP3 e caspase-1 no hipocampo de camundongos (CAMARGO et al., 2020).

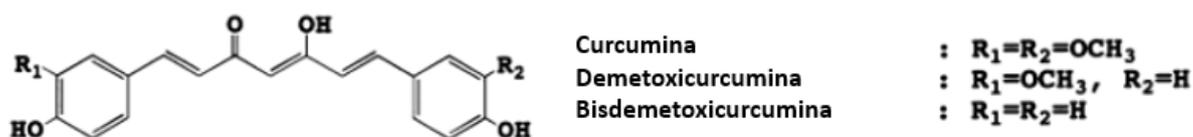
Ao avaliar a ação da vitamina D no modelo de depressão induzido por LPS, um estudo evidenciou que a administração de um análogo de vitamina D2 – o paricalcitol por 14 dias seguido de um desafio com LPS no décimo quinto dia, foi capaz de prevenir o comportamento do tipo depressivo induzido pelo modelo no teste de nado forçado e no teste de suspensão pela

cauda e no teste de preferência por sacarose, revertendo o comportamento anedônico induzido pelo LPS (HE et al., 2019). Além destes efeitos, o paricalcitol foi capaz de diminuir o imunocontéudo de IL1 $\beta$  no soro e no hipotálamo dos camundongos, além de atenuar a expressão de IBA-1, NF- $\kappa$ B, NLRP3 e caspase-1 (HE et al., 2019). Um estudo utilizando cultura de neurônios da glia que investigou a resposta de vitamina D na presença de LPS, evidenciou que a vitamina D foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS, sugerindo que a vitamina D poderia ser utilizada em condições neuroinflamatórias (HUANG et al., 2015).

### 1.4.2 Curcumina

Curcumina, também chamada diferuloimetano, é um composto fenólico natural e o maior componente da *Curcuma longa* (açafrão). Os três curcuminóides que constituem a *Curcuma longa* são: curcumina (diferuloimetano), a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina (figura 7) (LOPRESTI, 2022). Tradicionalmente é utilizada em países Asiáticos e é amplamente utilizada na preparação de comidas, cosméticos ou em práticas medicinais (BHAT et al., 2019).

Figura 7 - Estrutura química dos curcuminóides da *Curcuma longa*



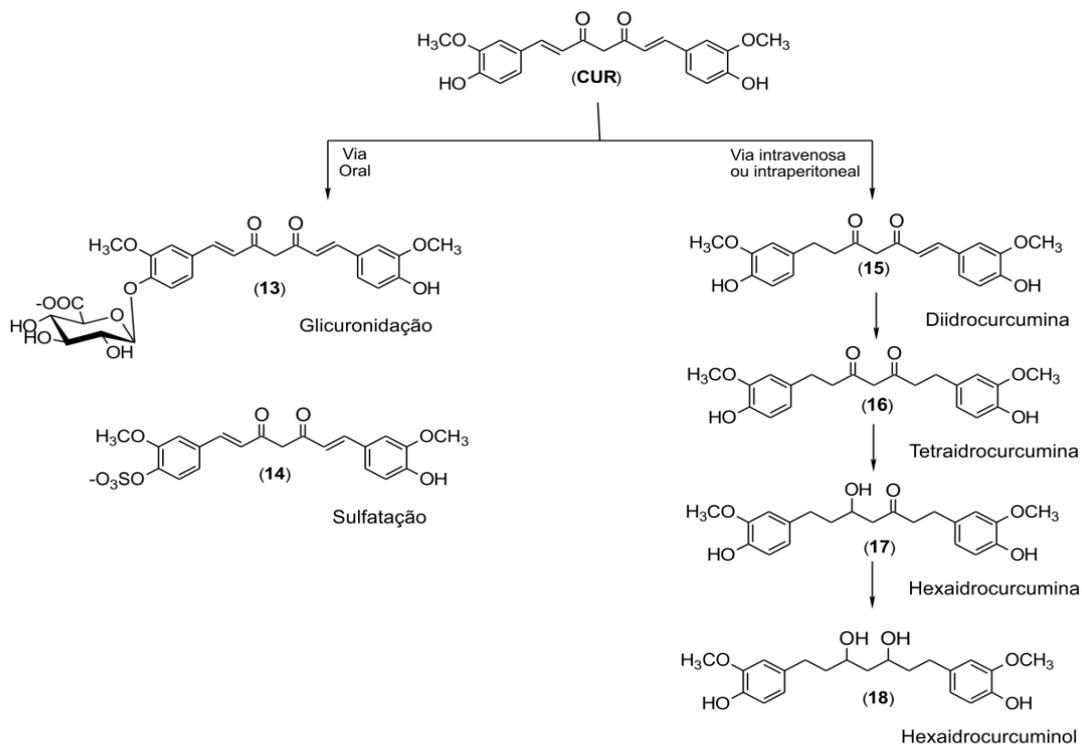
Fonte: adaptado de (ASAI; MIYAZAWA, 2000).

A curcumina é um polifenol lipofílico, insolúvel em água, mas estável em pH ácido (WANG et al., 1997) e apresenta alta taxa de decomposição em pH neutro ou básico, com susceptibilidade à degradação fotoquímica (TOMREN et al., 2007). A absorção e a administração de curcumina são importantes processos para que ocorra a atividade biológica. Quando é administrada por via oral, a curcumina é rapidamente metabolizada enzimaticamente, principalmente na mucosa intestinal, rins e fígado. Como mostrado na figura 8, no fígado a curcumina sofre conjugação com ácido glicurônico e com sulfato. Após a ação enzimática que

ocorre no fígado, a curcumina conjugada (forma inativa – que será excretada na urina e fezes) e a curcumina livre (forma ativa, segue para a circulação e atuam nos mecanismos alvos) (ASAI; MIYAZAWA, 2000; OZAWA et al., 2017). Já a administração intraperitoneal ou venosa gera metabólitos reduzidos, como tetraidrocurcumina. Desta forma, a metabolização da curcumina é rápida, ocasionando a eliminação sistêmica com rapidez e em grande quantidade, um desafio para a absorção do composto (ANAND et al., 2007).

A curcumina também pode ativar diversos alvos moleculares por ser uma molécula pleiotrópica, que pode atuar em fatores transcricionais, fatores de crescimento e seus receptores, proteínas cinases, moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias, proteínas relacionadas à apoptose, entre outras (ZHOU; BEEVERS; HUANG, 2011). A curcumina também se apresenta como um ligante de baixa afinidade aos receptores de vitamina D, que pode resultar em interações genômicas do receptor e a transcrição de múltiplos genes, muitas vezes longe do sítio de atuação do VDR, podendo exercer em alguns casos uma ação reguladora na ausência do calcitriol (BARTIK et al., 2010; HAUSSLER et al., 2016).

Figura 8 - Metabólitos da curcumina em diferentes vias de administração



A curcumina administrada por via oral sofre reações de glicuronidação e de sulfatação, o que permite que possa exercer suas funções biológicas e ser posteriormente excretada. Por via intravenosa ou intraperitoneal, ela sofre reações de redução, sendo convertida em diidrocurcumina, tetraidrocurcumina, hexaidrocurcumina e hexaidrocurcuminol. Fonte: SUETH-SANTIAGO et al., 2015.

A curcumina apresenta diversos benefícios e é relatado que ela possui propriedades neuroinflamatórias (SAIED et al., 2021), antioxidantes (SAMARGHANDIAN et al., 2017), neuromoduladoras (ZHAO et al., 2019b) e neuroprotetoras (RUBAB et al., 2021). Esses efeitos poderiam promover benefícios em diversas transtornos e doenças relacionados à inflamação, como a depressão (LOPRESTI, 2017) e em transtornos psiquiátricos como o transtorno bipolar (KAUFMANN et al., 2016) e ansiedade (HAIDER et al., 2015).

Estudos clínicos avaliaram o efeito da curcumina em pacientes que possuem diagnóstico de depressão. Nestes estudos uma resposta antidepressiva e melhora no humor foi observada com o uso de doses de 1000 mg/dia por 6 (PANAHI et al., 2014) ou 8 semanas (LOPRESTI et al., 2014). A administração por 8 semanas de 500 mg/dia, 1000 mg/dia ou de 1000 mg/dia mais Saffron® resultou na melhora dos sintomas do tipo depressivo em pacientes homens e mulheres, sem diferença entre as doses administradas (LOPRESTI; DRUMMOND, 2017). Em outro estudo em que foram administradas 80 mg de nano-curcumina uma vez ao dia por 8 semanas, o grupo tratado com curcumina em comparação ao placebo reduziu significativamente os escores de depressão e ansiedade, mas não do estresse (ASADI et al., 2020). Em outro estudo, a suplementação com 2000 mg/dia por 6 semanas evidenciou que a curcumina diminuiu o escore das escalas de depressão aplicadas nos pacientes, bem como os níveis séricos de IL-1 $\beta$ , aumentou os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e diminuiu as concentrações séricas de cortisol em comparação ao grupo placebo, demonstrando que a curcumina foi eficiente em melhorar o quadro de depressão desses pacientes, como poderia ser um potencial composto terapêutico para a depressão (YU et al., 2015).

Em estudos pré-clínicos com a curcumina, a administração crônica ou aguda realizada em ratos e camundongos reduziu o tempo de imobilidade no teste de natação forçada e no teste de suspensão pela cauda, o que sugere efeito tipo-antidepressivo (LI et al., 2009; LIAN et al., 2018; LOPRESTI; HOOD; DRUMMOND, 2012; XU et al., 2005; ZHANG et al., 2012b). Também foi demonstrado que o tratamento com curcumina por 7 dias em ratos foi capaz de prevenir o comportamento do tipo-depressivo induzido por LPS (LOPRESTI; HOOD; DRUMMOND, 2012). Outro estudo que realizou a pré-administração de curcumina por 7 dias e o desafio com o LPS no oitavo dia demonstrou que a curcumina reverteu o comportamento do tipo depressivo desencadeado pelo LPS e de apresentar efeitos neuroprotetores ao dano

causado pelo LPS por suprimir vias que atuam na neuroinflamação, como a supressão de NF- $\kappa$ B (RUBAB et al., 2021). Outro estudo similar, com pré-administração de vitamina D por 7 dias e desafio com LPS mostrou que a curcumina foi capaz de exercer efeitos de neuroproteção, prevenindo o dano hipocampal e inibindo o estresse nitrosativo (JANGRA et al., 2016). Em um modelo de colite, a curcumina foi capaz de suprimir a expressão de NF- $\kappa$ B, TLR e MyD88 (molécula sinalizadora crítica na sinalização de TLR), que poderiam ser alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos tratamentos (LUBBAD; ORIOWO; KHAN, 2009). Além do exposto, um estudo de WANG et al. (2014) demonstrou que a curcumina preveniu o comportamento do tipo depressivo induzido pelo LPS no teste de suspensão pela cauda, teste de preferência de sacarose e no teste de nado forçado, além de prevenir a ativação microglial no grupo tratado com curcumina, através da regulação de NF- $\kappa$ B e foi capaz de diminuir o imunoconteúdo de iNOS e IL-1 $\beta$  tanto no hipocampo, quanto no córtex pré-frontal (WANG et al., 2014). Além disso, em um estudo *in vitro* em monócitos-macrófagos de ratos, a curcumina atenuou a resposta celular ao desafio com LPS, causando redução de NO e diminuição de iNOS e de metabólitos relacionados à ativação da via do NF- $\kappa$ B (ZHAO et al., 2015). Similar ao resultado anterior, a curcumina atenuou a produção de NO em um estudo *in vitro* em células microgliais. Da mesma forma, inibiu a expressão de NF- $\kappa$ B e iNOS. Esse estudo sugeriu devido à baixa toxicidade da curcumina, que ela poderia ser uma alternativa terapêutica interessante para prevenir a produção de RNS no tratamento nas doenças neurodegenerativas/inflamatórias (JUNG et al., 2006). Em modelos de estresse crônico, a curcumina exerceu efeito antidepressivo associado com a atenuação da apoptose neuronal causada pelo modelo (FAN et al., 2019; VASILEVA et al., 2018) e também diminuiu a expressão elevada deIDO no hipocampo de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (ZHANG et al., 2019). Além do exposto, a curcumina preveniu a perda de espinhos dendríticos e comprimento dendrítico e volume das superfícies dos neurônios no córtex pré-frontal medial em ratos (NOORAFSHAN et al., 2015), o que poderia estar relacionado ao seu efeito anti-inflamatório.

### 1.4.3 Associação dos compostos

A utilização de compostos naturais destaca-se nos últimos anos, devido aos problemas encontrados por diversos pacientes, principalmente nos que possuem dificuldade à resposta aos

antidepressivos (DOME et al., 2019). Dessa forma, minerais, hormônios e nutracêuticos poderiam atuar como terapia coadjuvante no tratamento da depressão (PAPAKOSTAS; IONESCU, 2015).

Há evidências que sugerem que a vitamina D e a curcumina exercem um papel importante na prevenção da inflamação. Um estudo de Farghali e colaboradores em 2020 demonstrou a importância da vitamina D e da curcumina e as possibilidades de utilizá-las em conjunto, visto que a vitamina D e a curcumina como suplementação oral seriam úteis e possuem propriedades neuroprotetoras (FARGHALI et al., 2020). Um estudo de Oliveira e colaboradores em 2020 evidenciou que o calcitriol – forma ativa da vitamina D, preveniu a neuroinflamação diminuindo a o RNA mensageiro de proteínas que compõem a via inflamatória do inflamassoma NLRP3, como NLRP3, ASC, Caspase-1 e IL-1 $\beta$ . Esse estudo também demonstrou que a vitamina D foi capaz de diminuir a permeabilidade da BHE, atenuando a inflamação (DE OLIVEIRA et al., 2020). Assim como a vitamina D, a curcumina é um composto que pode reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, é capaz de exercer efeito antiinflamatórios inibindo a ciclooxigenase 2, NF- $\kappa$ B, conseqüentemente atenuando diversas vias que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TLR/NLRP3/IL-1 $\beta$  (CIANCIULLI et al., 2022).

Visto que a depressão pode ser associada à neuroinflamação, estes compostos poderiam possuir efeito antidepressivo devido a esta propriedade. No entanto, o efeito da associação de vitamina D e curcumina em modelos animais de depressão e ansiedade e em estudos clínicos ainda não é relatado na literatura. Entretanto, outros estudos já demonstraram que a coadministração destes compostos possui resultados promissores em outros tipos de doenças, como artrite (DA SILVA et al., 2019; HEMSHEKHAR et al., 2021), doença de Alzheimer (CHEN et al., 2018) e câncer de mama (ATTIA et al., 2020). Um estudo *in vitro* de Alamro e colaboradores em 2020 reproduziu um modelo de Alzheimer em culturas de células neuronais corticais que foram expostas ao peptídeo  $\beta$  amilóide (A $\beta$ ) por diferentes períodos de tempo, bem como foram tratadas com vitamina D e curcumina demonstrou que a associação dos compostos foi capaz de atenuar os efeitos dos produtos da peroxidação lipídica causadas por A $\beta$ . Além disso, a associação exerceu efeitos antiinflamatórios, aumentando o conteúdo de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, melhorando a recuperação das células do tratamento com A $\beta$ , demonstrando o potencial da vitamina D e da curcumina para o tratamento de doenças que envolvam inflamação (ALAMRO et al., 2020). Tomadas em conjunto, essas evidências sugerem que a suplementação com colecalciferol e curcumina possa ser promissora na depressão e na ansiedade.

## 2 JUSTIFICATIVA

A descoberta de novos tratamentos para a depressão é fomentada pelo fato de que existem pacientes resistentes aos tratamentos convencionais, realizados com fármacos que modulam o sistema monoaminérgico, que conseguem reestabelecer as monoaminas na fenda sináptica rapidamente, mas não produzem efeito rápido e ainda proporcionam efeitos terapêuticos indesejados (OTTE et al., 2016). Não obstante, outros mecanismos que podem estar envolvidos com a depressão, como a neuroinflamação, podem ser novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de outros compostos que, como os nutracêuticos poderiam exercer um papel importante no tratamento da depressão.

Por possuírem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetor, o colecalciferol e a curcumina são compostos interessantes, pois além de apresentarem estas propriedades, têm acesso facilitado à população e poderiam ser incluídos na dieta ou como suplementação. Esta premissa é baseada no fato de que a suplementação de vitamina D, por exemplo, é uma prática comum na atualidade e a curcumina é utilizada com frequência na preparação de alimentos (DA SILVA SOUZA et al., 2020) e de que a curcumina, quando suplementada, pode trazer benefícios por suas propriedades (SHEN et al., 2013).

Alguns estudos reportam que administração da curcumina e vitamina D pode produzir efeitos benéficos em relação a outras doenças de caráter inflamatório (ATTIA et al., 2020; CHEN et al., 2018; DA SILVA SOUZA et al., 2020). Nestes estudos o tratamento com curcumina e vitamina D exerceu efeito antiinflamatório, antioxidante e neuroprotetor.

Em relação à depressão e ansiedade, não existem relatos de estudos que realizem a associação de vitamina D e de curcumina, apenas da utilização dos compostos administrados de forma separada. Considerando as evidências que podem ser encontradas em literatura dos benefícios dos compostos, acredita-se que a associação de colecalciferol e curcumina possa ser promissora no tratamento destes transtornos psiquiátricos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antidepressivo da associação de colecalciferol e curcumina e um modelo animal de depressão induzido por LPS em camundongos *Swiss* fêmeas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar se a administração de colecalciferol e/ou curcumina é capaz de prevenir o comportamento tipo depressivo induzido pela administração do LPS;

b) Investigar se a administração de colecalciferol e/ou curcumina é capaz de prevenir as alterações neuroinflamatórias causadas pela administração do LPS no córtex pré-frontal.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

A utilização de animais neste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo 9317190221. Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (30-40 g) com 60-90 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e encontraram-se alojadas no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, mantidos a 20-22°C com acesso livre à água e comida e ciclo claro/escuro 12/12 h. Os animais tiveram acesso à ração comercial para camundongos e água filtrada potável. As manipulações dos animais foram realizadas entre as 9 h e 17 h, sendo cada animal utilizado uma vez. Os camundongos foram agrupados em um número de 8 por caixa (dimensão 49x 34x 16 cm) de polipropileno opaco branco com tampa de arame.

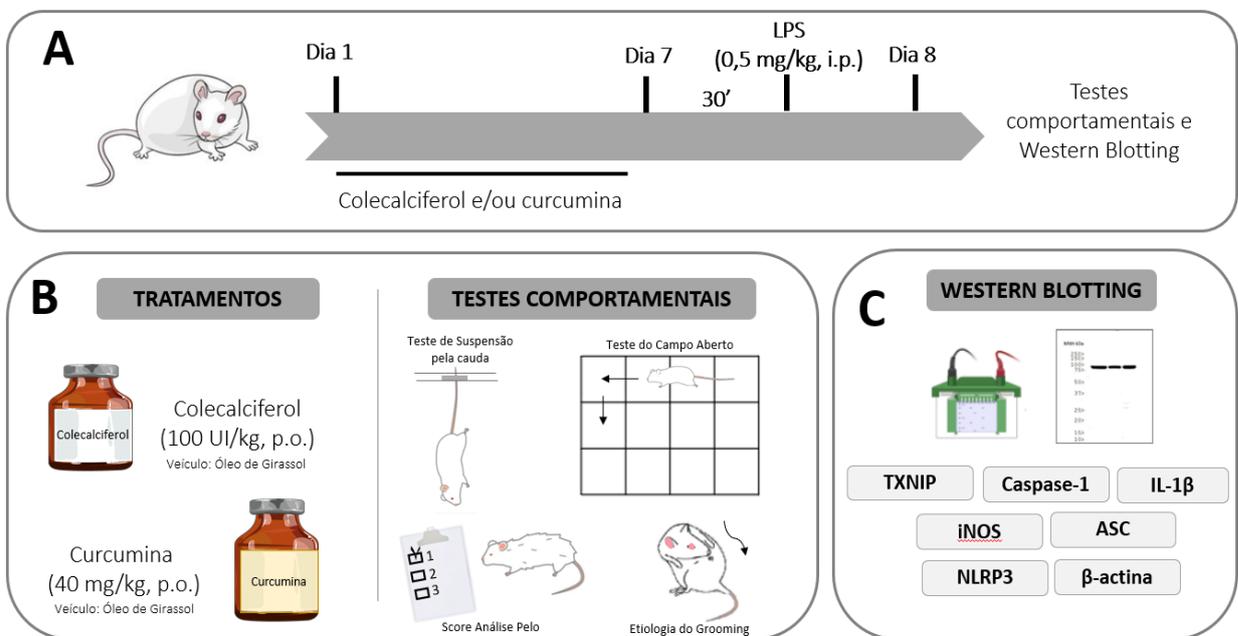
### 4.2 COMPOSTOS NUTRACÊUTICOS E TRATAMENTO

Neste experimento realizou-se a administração de colecalciferol e/ou curcumina e/ou veículo (óleo de girassol) por 7 dias, seguido do desafio pelo LPS (veículo – salina), com o intuito de avaliar se os compostos poderiam prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pelo lipopolissacarídeo (figura 9).

Para o protocolo de tratamento, os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos experimentais, com 8 animais por grupo: (1) controle (veículo p.o.) + salina (i.p.); (2) colecalciferol (p.o.) + salina (i.p.); (3) curcumina (p.o.) + salina (i.p.); (4) associação de colecalciferol (p.o.) + curcumina (p.o.) + salina (i.p.); (5) LPS (veículo, p.o.) + LPS (i.p.); (6) colecalciferol (p.o.) + LPS, (i.p.); (7) curcumina (p.o.) + LPS (i.p.); (8) associação de colecalciferol (p.o.) + curcumina (p.o.) + LPS (i.p.). Os animais que foram tratados por gavagem oral, receberam como veículo óleo de girassol e os grupos tratados com curcumina (Sigma Aldrich C1386-5) foram administrados com a dose de 40 mg/kg/dia e os grupos tratados com colecalciferol (Addera®) receberam 100 UI/kg/dia, ambos compostos diluídos em óleo de girassol. Os animais tratados por via intraperitoneal receberam como veículo solução salina (0,9%) e como tratamento, o LPS (Sigma Aldrich, E. coli O111:B4) foi diluído no veículo e

administrado na dose de 0,5 mg/kg. Os animais receberam o tratamento por 7 dias com curcumina, colecalciferol ou veículo, de acordo com seus respectivos grupos e trinta minutos após a última administração, os animais receberam a administração de LPS (desafio inflamatório). Após 24 h do desafio com LPS, os animais foram submetidos aos testes comportamentais na seguinte ordem: 1) teste de suspensão pela cauda; 2) fotografia do pelo dos animais; 3) teste do campo aberto. Posteriormente, ocorreu a eutanásia por decapitação e dissecação do córtex pré-frontal. Os animais utilizados nos testes comportamentais foram os mesmos utilizados para retirada das estruturas para a realização do Western Blotting.

Figura 9 - Protocolo experimental para avaliação do efeito tipo antidepressivo do colecalciferol e da curcumina quando submetidos aos testes comportamentais



A figura 9 mostra o desenho experimental do trabalho. Em A, observa-se o cronograma do experimento, em que a administração de curcumina e/ou colecalciferol ou óleo de girassol ocorreu durante 7 dias. No sétimo dia, trinta minutos após a última administração, foi realizado o desafio com LPS (0,5 mg/kg, i.p.) e 24 h após a administração de LPS foram realizados os testes comportamentais; em B, estão mostrados os tratamentos e doses, sendo o colecalciferol administrado na dose de 100 UI/kg por via oral e a curcumina administrada na dose de 40 mg/kg por via oral. Realizou-se os testes comportamentais: teste de suspensão pela cauda, teste do campo aberto, análise do pelo e análise do comportamento de autolimpieza (*grooming*); em C, está representada a técnica de Western Blotting, pela qual foram avaliadas as proteínas TXNIP, caspase-1, iNOS, IL-1β, ASC e β-actina. Fonte: a autora, 2022.

#### 4.3 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

O teste de suspensão pela cauda é um teste preditivo, utilizado no estudo de moléculas com efeito tipo-antidepressivo, bem como possibilita a determinação de fenótipo tipo-depressivo induzido por modelos animais e na reversão desses comportamentos por potenciais agentes que possuem resposta tipo antidepressiva (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019). Nesse teste os animais são submetidos a uma situação de estresse - posição em que o animal esteja suspenso pela cauda, da qual é impossível escapar. Esse teste se baseia no paradigma do desespero comportamental decorrente da situação inescapável em que o camundongo se encontra. No início do teste, os camundongos assumem comportamentos ativos, realizando tentativas de fuga, entretanto como a situação é inevitável, os animais passam a apresentar comportamento de imobilidade. Para o teste, os camundongos foram suspensos pela cauda, 50 cm do chão, por uma fita adesiva presa 1 cm a partir da ponta da cauda do animal (STERU et al., 1985). O teste teve duração de 6 minutos, sendo avaliado o tempo total de imobilidade (ausência de movimentos/movimentação passiva), registrada em segundos (CAMARGO et al., 2021b). Um maior tempo de imobilidade do camundongo refere-se à um fenótipo do tipo-depressivo.

#### 4.4 TESTE DO CAMPO ABERTO

Para descartar qualquer efeito dos tratamentos sobre a atividade locomotora dos animais, foi realizado o teste do campo aberto (CAMARGO et al., 2020). O aparato utilizado para realizar esse teste possui as dimensões 40 x 60 x 50 cm, divididas em 12 quadrantes iguais, desenhados na parte inferior da caixa. O teste foi filmado e teve a duração de 6 minutos, no qual foi contabilizada a distância que o animal percorreu dentro do aparato através do Software Any-maze. A base da caixa foi higienizada com álcool 10% entre os intervalos das trocas dos animais.

#### 4.5 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA

O comportamento de autolimpeza (também chamado de *grooming*), é caracterizado como um comportamento complexo inato e etnologicamente rico, bastante sensível ao estresse, que normalmente procede na direção cefalocaudal e consiste em diversas etapas (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005; VAN ERP et al., 1994). Esse teste é realizado analisando as imagens obtidas no teste de campo aberto, extraindo-se os parâmetros de latência, número de comportamentos de autolimpeza, tempo total gasto no comportamento de autolimpeza, autolimpeza rostral e corporal e tem como objetivo avaliar o fenótipo tipo ansioso dos camundongos, com base nos comportamentos de autolimpeza não-induzidos. Roedores que possuem um fenótipo tipo ansioso tendem a aumentar a quantidade de vezes e o tempo que realizam autolimpeza, bem como apresentam uma diminuição na latência para iniciar esse comportamento (KALUEFF et al., 2016). A autolimpeza rostral considera a limpeza das patas dianteiras, nariz, face, orelhas e cabeça e a autolimpeza corporal, a autolimpeza das patas traseiras, cauda e genitais. As características dos comportamentos de autolimpeza foram analisadas durante 6 minutos da duração do teste (FRAGA et al., 2018).

#### 4.6 ESCORE PARA AVALIAÇÃO DO ESTADO FÍSICO DO PELO

Animais que são expostos a estressores, como LPS, apresentam uma diminuição do comportamento de autocuidado, caracterizando-se pela degradação do estado físico da pelagem dos camundongos, bem como podem apresentar pelagem suja. A avaliação da qualidade do pelo dos camundongos é realizada para que se avalie o impacto do estresse no metabolismo de roedores e está descrito em Alonso et al., (2004). Esse teste consiste na análise das imagens dos camundongos (foram obtidas antes após a realização do testes comportamental de suspensão pela cauda) e consiste na classificação do estado físico do pelo dos animais. Para isso, é utilizado um escore de 1-3, que classifica os animais conforme a tabela 1. A análise do escore foi realizada por dois observadores que não tinham conhecimento da identificação dos grupos, de forma randomizada.

Tabela 1 - Escore para Avaliação do Estado Físico do Pelo dos Animais

<b>ESCORE</b>	<b>Estado Animal</b>
<b>1</b>	Pelo com danos, erupção cutânea ou sujo
<b>2</b>	Estado intermediário
<b>3</b>	Saudável, pelo normal

Fonte: ALONSO et al., 2004.

#### 4.7 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOTTING*

O córtex pré-frontal foi homogeneizado mecanicamente em 300 µL de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e Coquetel inibidor de proteases). O material lisado foi centrifugado (10000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (200 µl) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8%) foi aquecido a 100°C por 5 min. Após homogeneização, retirou-se uma alíquota para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se em uma proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8), finalizando o procedimento com adição de β-mercaptoetanol 8%. As proteínas (60 µg de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 10% - 14% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida (CAMARGO et al., 2021a). Em seguida, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%. Na sequência, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com albumina bovina 5% (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O imunoconteúdo das formas das proteínas IL-1β (Cell Signaling – D3A3Z), TXNIP (Cell Signaling – D5F3E), ASC (Cell Signaling – E1E3I), caspase-1 (Cell Signaling – D7F10) e iNOS (Cell Signaling – E2M9F) foram identificadas através do uso destes anticorpos específicos, todos diluídos 1:1000. A β-actina (Cell Signaling – D6A8, 1:1000) foi utilizada como controle de carga. As membranas foram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos imunocomplexos, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2500) e a imunoreatividade das

bandas foi revelada por quimiluminescência com o reagente ECL (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) segundo especificações do fabricante e com o uso do equipamento de revelação Chemidoc® (Bio-Rad Laboratories). O imunoc conteúdo de IL-1 $\beta$ , TXNIP, ASC, caspase-1 e iNOS foi determinado pela razão da densidade óptica (DO) das bandas pela DO da banda da  $\beta$ -actina. A DO das bandas foi quantificada usando Image Lab software® 4.1 (Bio-Rad Laboratories).

#### 4.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

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

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da normalidade dos dados foi realizada pelo teste D'Agostino-Pearson. As diferenças entre os grupos experimentais para variáveis com distribuição normal, foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado (resultado significativo da ANOVA). Para a avaliação de dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, quando apropriado. Considerou-se significativos os resultados com  $p < 0,05$  e para a realização das análises utilizaram-se os softwares GraphPad® versão 9.0 e Microsoft Excel® para tratamento dos dados.

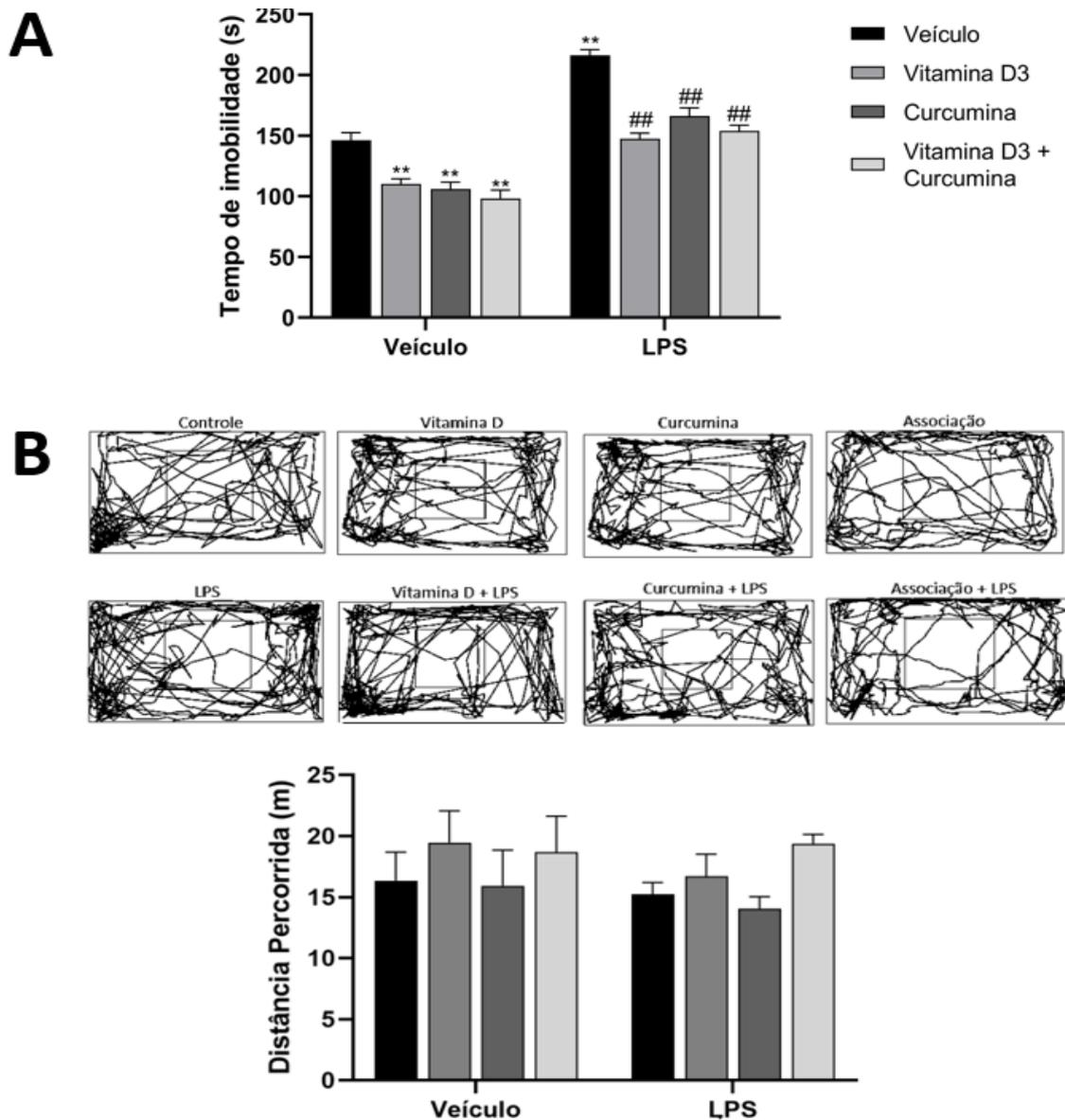
## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DO COLECALCIFEROL E/OU CURCUMINA EM CAMUNDONGOS APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA E NA LOCOMOÇÃO AVALIADA NO TESTE DE CAMPO ABERTO

Como mostra a figura 10A, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,55)}= 41,90$ ,  $p<0,01$ ], no desafio com LPS [ $F_{(1,55)}= 202,7$ ,  $p<0,01$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,55)}= 3,011$ ,  $p<0,05$ ]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o tratamento por 7 dias com colecalciferol na dose de 100 UI/kg/dia, com curcumina na dose de 40 mg/kg/dia e a associação dos dois compostos (colecalciferol 100 UI/kg/dia e curcumina 40 mg/kg/dia) diminuiu significativamente o tempo de imobilidade ( $p<0,01$ ) em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda em comparação com o grupo controle tratado com veículo. O LPS foi capaz de aumentar significativamente o tempo de imobilidade ( $p<0,01$ ) dos camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda e os tratamentos com colecalciferol, curcumina ou com a associação, foram capazes de prevenir o aumento do tempo de imobilidade ( $p<0,01$ ) causado pelo LPS.

Para descartar a hipótese de que o efeito encontrado no teste de suspensão pela cauda tenha sido em decorrência de uma alteração locomotora dos camundongos, na figura 10B está mostrado o resultado do teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,48)}= 1,637$ ,  $p=0,193$ , no desafio com LPS [ $F_{(1,48)}= 0,7178$ ,  $p=0,401$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,48)}= 0,2470$ ,  $p=0,863$ ] no parâmetro de distância total percorrida, obtido através do software Anymaze. Estes dados indicam que os resultados encontrados no teste de suspensão pela cauda não podem ser atribuídos a uma alteração locomotora dos animais.

Figura 10 - Efeito da pré-administração por 7 dias de curcumina e colecalciferol em camundongos desafiados com LPS e submetidos ao teste de suspensão pela cauda e ao teste de campo aberto.



O colecalciferol (100 UI/kg/dia), curcumina (40 mg/kg/dia) ou a associação dos compostos nessas mesmas doses foram administradas durante 7 dias nos camundongos e trinta minutos após a última administração, foi realizado o desafio com LPS. Os valores estão expressos como médias  $\pm$  E. P. M. (n=7-8). Em 10A estão mostrados os resultados do teste de suspensão pela cauda, avaliando-se o tempo de imobilidade; em 10B, estão mostrados os traçados representativos da distância percorrida no teste do campo aberto e os valores em média + EPM da distância percorrida em metros pelos animais no teste do campo aberto. \*\*  $p < 0,001$  em comparação com o controle tratado com veículo. ##  $p < 0,001$  em comparação com o grupo veículo tratado com LPS. Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Fonte: a autora, 2022.

## 5.2 EFEITO DO COLECALCIFEROL E/OU CURCUMINA EM CAMUNDONGOS APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NOS PARÂMETROS RELACIONADOS AO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO NAS ANÁLISES DO COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA E DO CAMPO ABERTO

Conforme mostrado na figura 11A, para o parâmetro de tempo no centro no teste de campo aberto, a ANOVA de duas-vias não demonstrou diferenças significativas para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,48)}= 0,494$ ,  $p=0,688$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,48)}= 0,1624$ ,  $p=0,921$ ]. Entretanto, foi possível observar uma diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,48)}= 0,718$ ,  $p<0,01$ ] quando comparados com os grupos controle, demonstrando o efeito principal do tratamento com LPS.

A figura 11B mostra o resultado da análise dos comportamentos de autolimpeza. A ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,53)}= 2,214$ ,  $p=0,097$ ], no desafio com LPS [ $F_{(1,53)}= 0,220$ ,  $p=0,641$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,53)}= 1,482$ ,  $p=0,230$ ] no parâmetro de latência para a autolimpeza, obtido no campo aberto em 6 minutos.

A figura 11C mostra o tempo total de autolimpeza dos camundongos submetidos ao campo aberto por 6 minutos. A ANOVA de duas vias não demonstrou diferenças significativas para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,48)}= 1,089$ ,  $p=0,367$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,48)}= 0,317$ ,  $p=0,813$ ], entretanto foi possível observar uma diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,48)}=25,490$ ,  $p<0,01$ ] quando comparados com os grupos controle, demonstrando o efeito principal do tratamento com LPS nesse parâmetro comportamental.

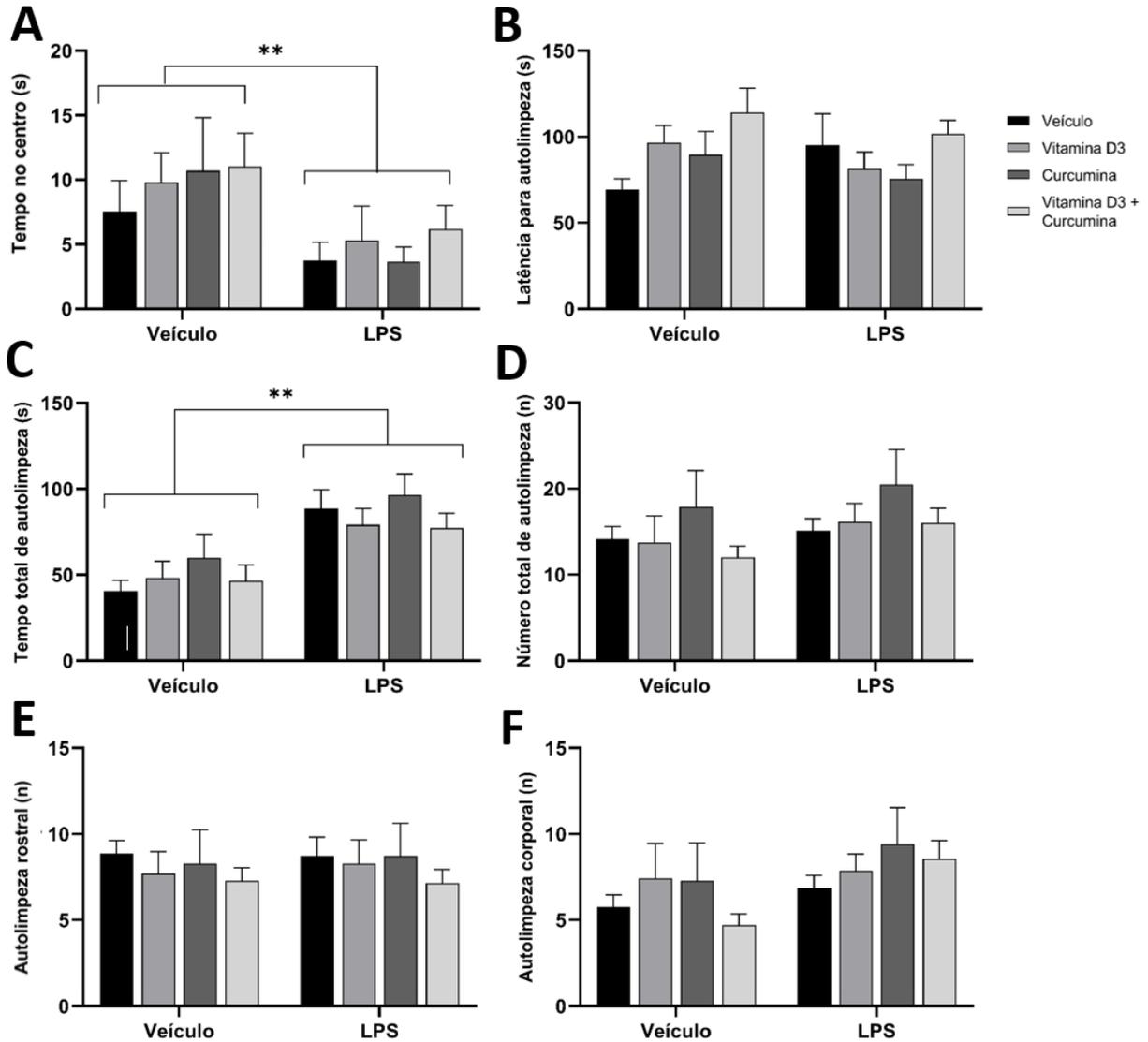
A figura 11D mostra o resultado da quantidade do comportamento de autolimpeza, obtidos no campo aberto, analisado por 6 minutos. A ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,54)}= 1,532$ ,  $p=0,217$ ], no desafio com LPS [ $F_{(1,54)}= 1,683$ ,  $p=0,200$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,54)}= 0,101$ ,  $p=0,959$ ] nesse parâmetro.

A figura 11E mostra os resultados da autolimpeza rostral obtidos no campo aberto. A ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,48)}= 0,541$ ,  $p=0,656$ ], no desafio com LPS [ $F_{(1,48)}=$

0,036,  $p=0,849$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,48)}= 0,0403$ ,  $p=0,9891$ ] nesse parâmetro.

A figura 11F mostra os resultados da autolimpeza corporal obtidos no campo aberto. A ANOVA de duas vias não evidenciou efeitos significativos para os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,50)}= 0,883$ ,  $p=0,456$ ], no desafio com LPS [ $F_{(1,50)}= 3,553$ ,  $p=0,065$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,50)}= 0,541$ ,  $p=0,656$ ] nesse parâmetro.

Figura 11 - Efeito do colecalciferol e/ou curcumina em camundongos desafiados com LPS nos parâmetros relacionados ao comportamento do tipo ansioso nas análises do comportamento de autolimpeza e do campo aberto



O colecalciferol (vitamina D) (100 UI/kg/dia), curcumina (40 mg/kg/dia) ou a associação dos compostos nessas mesmas doses foram administradas durante 7 dias nos camundongos e trinta minutos após a última administração, foi realizado o desafio com LPS. Os valores estão expressos como médias  $\pm$  E. P. M. (n=7-8), avaliados por ANOVA de duas vias. \*\* p<0,001 em comparação com os grupos tratados com veículo. Em 11A, apresenta-se o tempo no centro no teste do campo aberto, expresso em segundos; em 11B, a latência para a autolimpeza no teste do campo aberto, expressa em segundos; 11C, expressa o tempo total gasto na autolimpeza no campo aberto, expresso em segundos; 11D, número de comportamentos de autolimpeza no campo aberto; 11E, expressa o número de comportamentos de autolimpeza rostral no teste de campo aberto; 11F expressa o número de comportamentos de autolimpeza corporal, no teste do campo aberto. Fonte: a autora, 2022.

### 5.3 EFEITO DO COLECALCIFEROL E/OU CURCUMINA EM CAMUNDONGOS APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NA AVALIAÇÃO DO ESTADO FÍSICO DO PELO DOS ANIMAIS

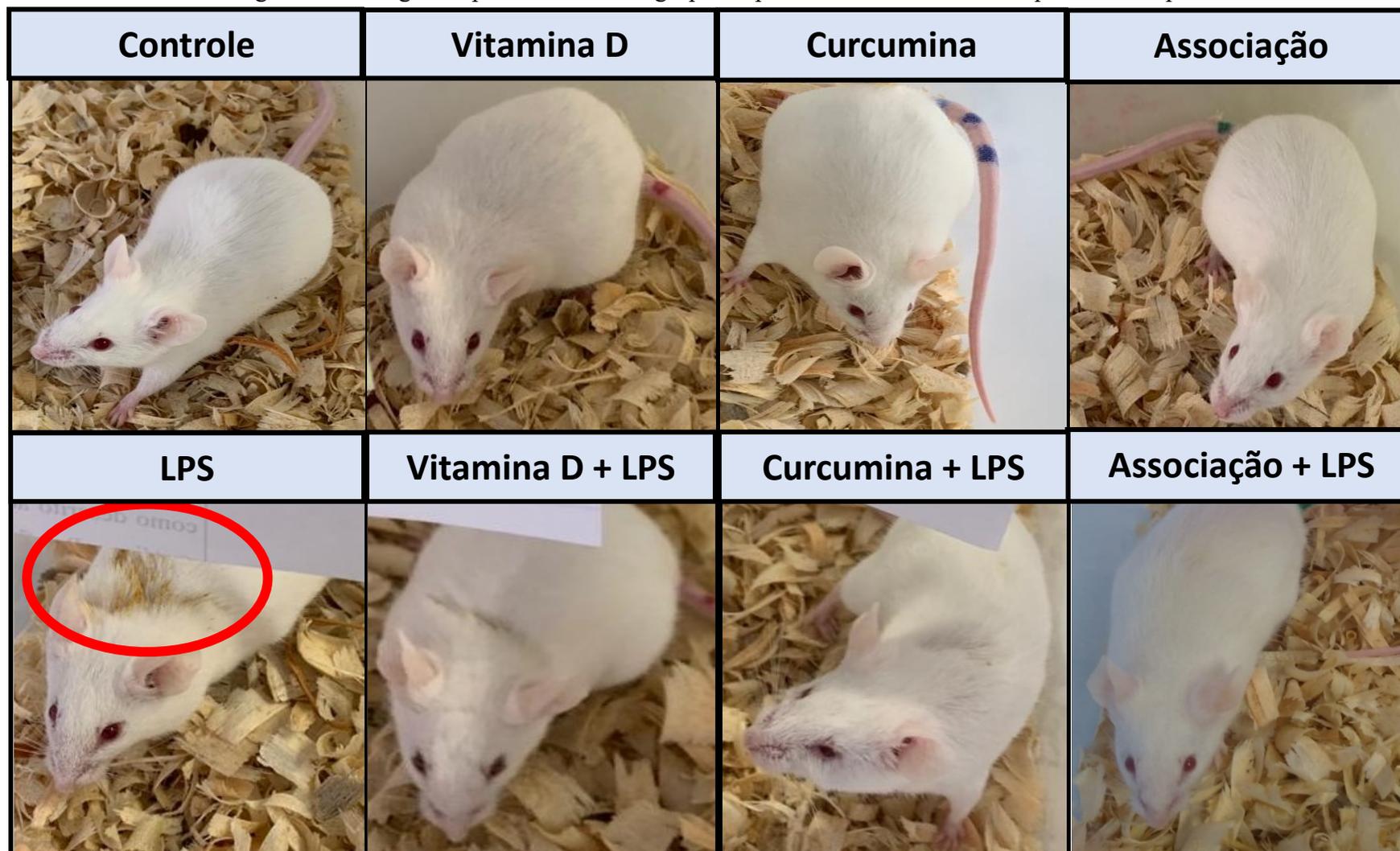
Na tabela 2, encontram-se os resultados da Avaliação do estado físico do pelos dos animais. O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença significativa entre os grupos. O teste *post hoc* de Dunn indicou que o grupo veículo LPS apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do escore do pelo em comparação ao grupo controle. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas no teste estatístico. Na figura 12, estão representadas as imagens dos animais, bem como seus respectivos tratamentos.

Tabela 2 – Resultados da Avaliação de autocuidado pelo escore do estado físico do pelo dos animais

<b>Grupos</b>	<b>Escore</b>
Veículo + Veículo	2.750 (2.250–3.000)
Veículo + Colecalciferol	2.750 (2.250–3.000)
Veículo + Curcumina	2.875 (3.000–3.000)
Veículo + Colecalciferol + Curcumina	2.875 (3.000–3.000)
LPS + Veículo	1.500 (1.000–2.000)*
LPS + Colecalciferol	2.500 (2.000–3.000)
LPS + Curcumina	2.625 (2.000–3.000)
LPS + Colecalciferol + Curcumina	2.375 (2.000–3.000)

Os dados estão expressos como mediana e interquartil (Q25-Q75, n=8). \* $P < 0.05$  diferença significativa se comparado ao grupo de tratamento veículo (Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn). Fonte: a autora, 2022.

Figura 12 – Imagens representativas dos grupos experimentais na Análise da qualidade do pelo



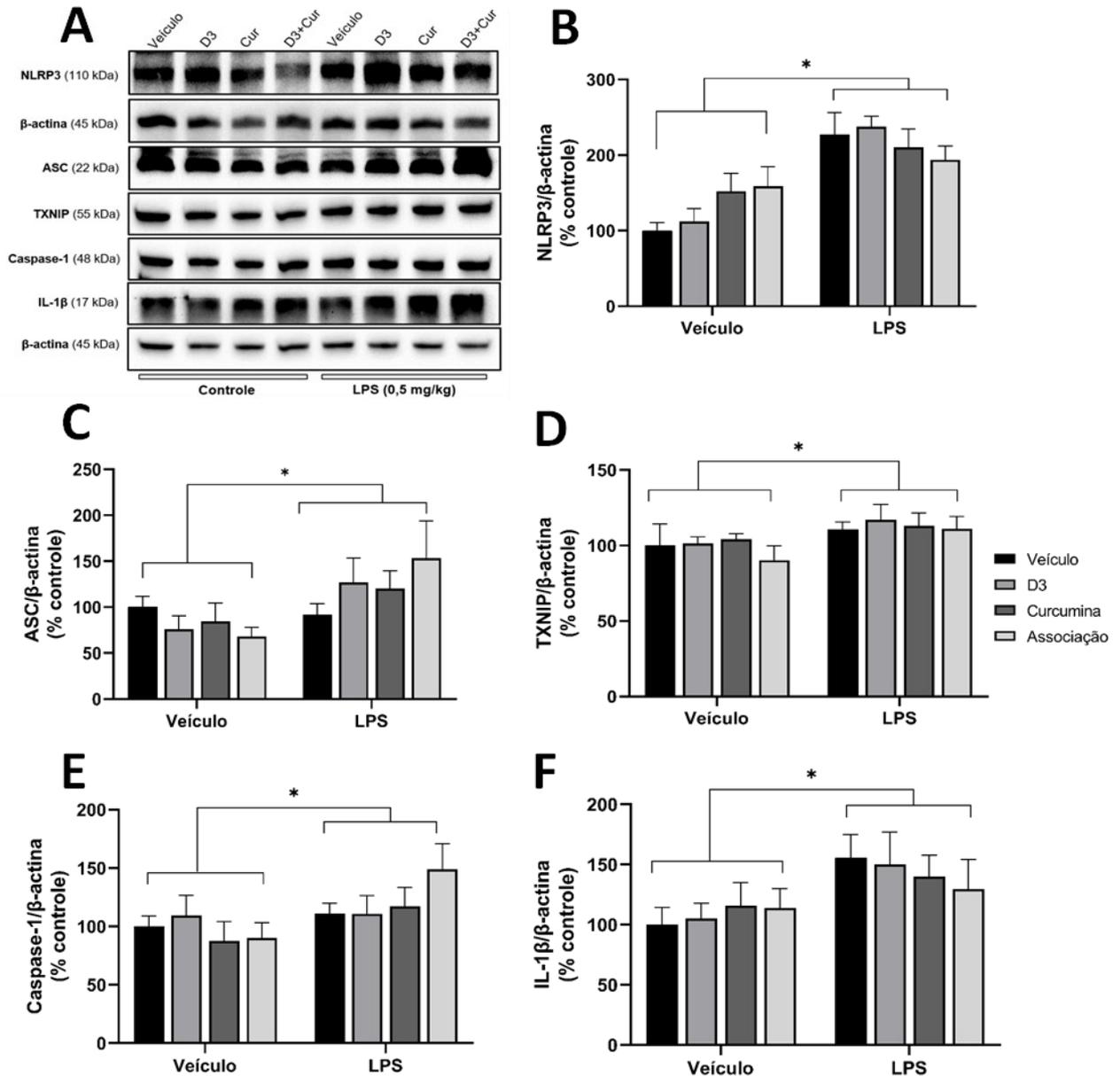
Fonte: A autora, 2022.

#### 5.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE COLECALCIFEROL E/OU CURCUMINA APÓS O DESAFIO COM LPS OU COM VEÍCULO NO IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A VIAS INFLAMATÓRIAS

A figura 13 mostra efeito dos tratamentos com vitamina D e/ou curcumina no desafio com LPS no imunoconteúdo de NLRP3 (13B), ASC (13C), TXNIP (13D), caspase-1 (13E) e IL-1 $\beta$  (13F) no córtex pré-frontal, avaliados pela técnica de Western Blotting. A ANOVA de duas vias não detectou alterações significativas do imunoconteúdo de NLRP3 nos grupos que receberam os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,38)}= 0,231$ ,  $p=0,874$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,38)}= 2,418$ ,  $p=0,081$ ], mas foi possível observar diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,38)}= 32,590$ ,  $p<0,05$ ] em comparação com grupos controle. Da mesma forma, a ANOVA de duas vias não detectou alterações significativas do imunoconteúdo de ASC nos grupos que receberam os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,40)}= 0,165$ ,  $p=0,919$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,40)}= 1,615$ ,  $p=0,201$ ], mas foi possível observar diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,40)}= 7,160$ ,  $p<0,05$ ] em comparação com grupos controle. Foi possível identificar o mesmo padrão ao avaliar o imunoconteúdo de TXNIP. A ANOVA de duas vias não detectou alterações significativas de TXNIP nos grupos que receberam os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,40)}= 0,421$ ,  $p=0,739$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,40)}= 0,199$ ,  $p=0,896$ ]. Entretanto, observou-se uma diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,40)}= 5,518$ ,  $p<0,01$ ] quando comparados com os grupos controles, evidenciando o efeito principal do tratamento com LPS. Assim como as proteínas anteriores, o mesmo padrão pode ser observado no imunoconteúdo de caspase-1 nos grupos que receberam os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,40)}= 0,483$ ,  $p=0,695$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,40)}= 1,343$ ,  $p=0,274$ ]. Contudo, observou-se uma diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,40)}= 5,372$ ,  $p<0,05$ ] quando comparados com os grupos controle, evidenciando o efeito principal do tratamento com LPS. Da mesma forma, foi possível identificar o mesmo padrão ao avaliar o imunoconteúdo de IL-1 $\beta$ , uma vez que não foram detectadas alterações nos grupos que receberam os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,40)}= 0,048$ ,  $p=0,985$ ] e na interação entre os

tratamentos e o LPS [ $F_{(3,40)} = 0,458$ ,  $p = 0,712$ ], mas foi possível observar diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,40)} = 6,531$ ,  $p < 0,05$ ] em comparação com grupos controle.

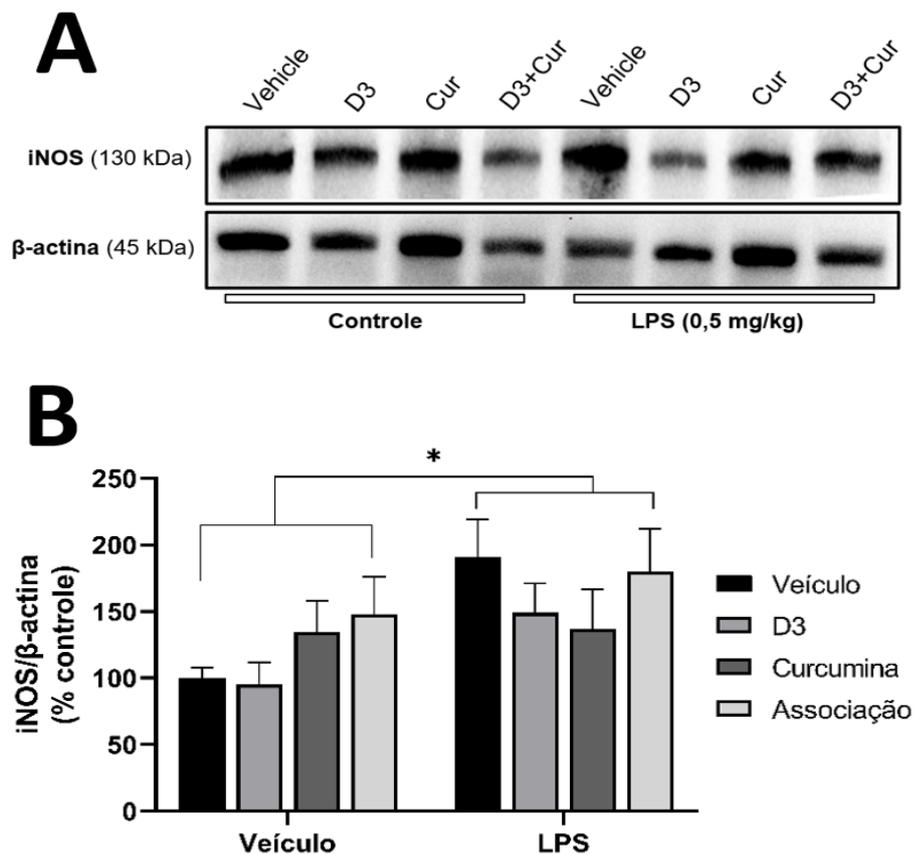
Figura 13 - Efeito da administração de colecalciferol e/ou curcumina após o desafio com LPS ou salina no imunocônteuo das proteínas NLRP3, ASC, TXNIP, caspase-1 e IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal de camundongos



A figura ilustra em 13A a imagem representativa do imunocônteuo de NLRP3, ASC, TXNIP, caspase-1 e IL-1 $\beta$ . Em 13B a quantificação do imunocônteuo de NLRP3; em 13C o imunocônteuo de ASC; em 13D está mostrado o imunocônteuo de TXNIP; em 13E o imunocônteuo de caspase-1 e em 13F o imunocônteuo de IL-1  $\beta$  no córtex pré-frontal de camundongos tratados com colecalciferol e/ou curcumina ou óleo de girassol e desafiados com LPS ou salina. Os resultados estão expressos como porcentagem do controle + E.P.M. (n=6).  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. D3: vitamina D3; Cur: curcumina; D3+Cur: vitamina D3 + curcumina. Fonte: a autora, 2022.

Utilizou-se a técnica de Western Blotting para avaliar o efeito dos tratamentos com curcumina e vitamina D e LPS no imunocónteuo de iNOS (figura 14). A ANOVA de duas vias não detectou alterações significativas de iNOS nos grupos que receberam os tratamentos com colecalciferol, curcumina e associação dos compostos [ $F_{(3,40)}=1,019$ ,  $p=0,394$ ] e na interação entre os tratamentos e o LPS [ $F_{(3,40)}=1,137$ ,  $p=0,345$ ]. Entretanto, observou-se uma diferença significativa nos grupos tratados com LPS [ $F_{(1,40)}=6,562$ ,  $p<0,05$ ] quando comparados com os grupos controles, evidenciando o efeito principal do tratamento com LPS.

Figura 14 - Efeito da administração de colecalciferol e/ou curcumina após o desafio com LPS ou salina no imunocónteuo de iNOS no córtex pré-frontal de camundongos



A figura ilustra em 14A a imagem representativa do imunocónteuo de iNOS e em 14B a quantificação do imunocónteuo de iNOS. Os resultados indicam o efeito do tratamento por 7 dias com colecalciferol e/ou curcumina ou óleo de girassol e o desafio com LPS no córtex pré-frontal de camundongos e estão expressos como porcentagem do controle + E.P.M. ( $n=6$ ).  $\beta$ -actina foi utilizada como controle de carga proteica. D3: vitamina D3; Cur: curcumina; D3+Cur: vitamina D3 + curcumina. Fonte: a autora, (2022).

## 6 DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que realiza a investigação de colecalciferol e curcumina e o desafio com LPS em tarefas comportamentais que avaliam comportamento do tipo depressivo e ansioso nos testes de suspensão pela cauda e campo aberto, respectivamente; nas análises etiológicas do comportamento de autolimpeza; avaliação do estado físico do pelo dos camundongos, bem como na investigação do envolvimento da via do NLRP3. O presente trabalho evidenciou que a curcumina e o colecalciferol podem exercer comportamento do tipo antidepressivo, mas a associação não tem efeito aditivo na resposta, embora o mecanismo molecular responsável por este efeito mereça ser melhor estudado.

Estudos anteriores demonstraram que a vitamina D (HE et al., 2019), bem como a curcumina (RUBAB et al., 2021) administradas separadamente, exerceram um comportamento do tipo antidepressivo no teste de suspensão pela cauda em camundongos. Nesse trabalho o colecalciferol, a curcumina e associação foram capazes de diminuir nos grupos controle o tempo de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda, caracterizando um efeito dos compostos *per se* nos camundongos. Esse resultado é importante, visto que é amplamente demonstrado na literatura que a suplementação com colecalciferol (PFOTENHAUER; SHUBROOK, 2017; VIETH, 1999) e curcumina (MEMARZIA et al., 2021; MANTZOROU et al., 2018; JABCZYK et al., 2021) tem benefícios, como diminuição do risco do desenvolvimento de doenças inflamatórias, imunes, doenças do trato gastrointestinal, câncer e diabetes. A associação dos dois compostos não causou efeito tipo antidepressivo aditivo ou sinérgico. A administração sistêmica de LPS é um modelo utilizado amplamente para reproduzir um modelo do tipo depressivo por neuroinflamação e tem-se por evidência que ele é responsável por alterar parâmetros comportamentais, sendo a redução na preferência por sacarose um dos parâmetros que evidenciam um comportamento anedônico em camundongos machos e fêmeas e o aumento do tempo de imobilidade em camundongos machos no nado forçado caracteriza um comportamento tipo depressivo desses animais (MELLO et al., 2018). Além do exposto, o LPS aumenta o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda tanto em machos (JIANG et al., 2021; ZHAO et al., 2019c), quanto em fêmeas (JIANG et al., 2021). Similar ao encontrado na literatura, o grupo tratado com LPS aumentou significativamente o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, caracterizando um comportamento do tipo depressivo nos animais. Um estudo mostrou que o pré-tratamento por

7 dias de curcumina (WANG et al., 2014), bem como o pré-tratamento por 14 dias de vitamina D (HE et al., 2019) são capazes de prevenir o aumento do tempo de imobilidade causado pelo desafio com LPS no teste de suspensão pela cauda. Nesse trabalho está demonstrado que assim como na literatura, os tratamentos dos grupos que receberam a administração de curcumina e o grupo que recebeu o tratamento com colecalciferol demonstraram uma prevenção do comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS quando pré-administrados por 7 dias, demonstrando o potencial antidepressivo dos compostos. Embora os grupos que receberam os tratamentos com colecalciferol e curcumina tenham demonstrado que esse pré-tratamento por 7 dias foi capaz de prevenir o comportamento do tipo depressivo induzido pelo LPS, não houve um efeito sinérgico da administração dos compostos.

O teste do campo aberto fornece parâmetros relacionados tanto à ansiedade, quanto à atividade locomotora dos animais (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Esse teste é realizado em paralelo com o teste de suspensão pela cauda e teste de nado forçado (que avaliam o comportamento tipo depressivo em roedores) para que possa servir de ferramenta para detectar possíveis alterações locomotoras provenientes dos compostos administrados (RODRIGUES et al., 1996). Nós mostramos que os tratamentos com colecalciferol, curcumina, associação entre colecalciferol e curcumina, ou LPS não alteraram a distância total percorrida pelos camundongos, descartando a possibilidade de que os tratamentos causaram interferência na atividade locomotora dos animais quando administrados nesse protocolo. Foi evidenciado no estudo de Mello et al (2018) um resultado semelhante, uma vez que 24 h após o desafio com LPS, tanto machos quanto fêmeas não apresentaram alteração da atividade locomotora no teste do campo aberto (MELLO et al., 2018). Em nosso estudo, a ausência de um efeito hipolocomotor ou hiperlocomotor decorrente dos tratamentos com colecalciferol, curcumina e/ou LPS indica que os resultados obtidos no teste da suspensão da cauda não podem ser atribuídos a um efeito locomotor inespecífico dos compostos administrados. Além disso, a ausência de efeito hipolocomotor do LPS no teste do campo aberto indica que em nosso protocolo, 24 h após a administração do LPS, não existe mais o comportamento associado à doença (*sickness behavior*). O estudo de Dantzer et al. (2008) menciona que o comportamento de desespero comportamental (avaliado no teste de suspensão pela cauda) desenvolve-se em animais e é afetado pelo desafio com LPS em até 6 h da administração. Após 24 h da administração dessa endotoxina, a atividade locomotora retorna ao nível basal (DANTZER et al., 2008). Corroborando os resultados desse trabalho e com os achados anteriores, um estudo

demonstrou que 6h após a administração de LPS, machos e fêmeas apresentaram uma diminuição da atividade locomotora (relacionado com comportamento do tipo doentio), efeito que não foi observado após 24h da administração de LPS (SENS et al., 2017).

Além da atividade locomotora, utilizamos o teste do campo aberto para avaliar os efeitos dos compostos nos parâmetros comportamentais desse teste que são úteis para inferir sobre respostas do tipo ansiolítica (PRUT; BELZUNG, 2003; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). A zona mais ansiogênica do teste do campo aberto é a zona central, ou seja, quanto menor o tempo que o animal explora o centro do aparato (sem diminuição da atividade locomotora), mais ansioso ele se encontra (BEHESHTI et al., 2020; PRUT; BELZUNG, 2003). A diminuição no tempo no centro no teste de campo aberto causada pelo LPS sugere um comportamento do tipo ansioso dos camundongos tratados com essa endotoxina. Esse resultado converge com o exposto na literatura, com evidências que demonstram que o LPS causa esta alteração comportamental relacionada à ansiedade tanto em camundongos machos (BEHESHTI et al., 2020; LACOSTA; MERALI; ANISMAN, 1999), quanto em fêmeas (WU et al., 2021). Embora tenham sido realizados os tratamentos com curcumina, colecalciferol ou associação, esses não foram capazes de prevenir esse efeito induzido pelo LPS, demonstrando que não são efetivos nessa dose e nesse desenho experimental para prevenir o comportamento do tipo ansioso induzido pelo LPS.

O teste de campo aberto também foi utilizado para observar parâmetros relacionados ao comportamento de autolimpeza dos camundongos. O comportamento de autolimpeza é considerado um parâmetro sensível ao estresse e o comportamento de ansiedade estaria relacionado ao aumento do tempo total de autolimpeza no teste do campo aberto (KALUEFF et al., 2016). Estudos prévios demonstraram que os camundongos fêmeas quando tratadas com LPS apresentam um fenótipo do tipo ansioso com o aumento do tempo total de autolimpeza quando comparado a machos (MELLO et al., 2018). Outro estudo demonstra ainda que, 6h após a administração de LPS existe um aumento do comportamento de autolimpeza, que persiste ainda 24h após a administração, mas não 48 h após o desafio com LPS (SENS et al., 2017). Nosso trabalho demonstrou que não houve diferença significativa no tempo de latência para o primeiro episódio de autolimpeza entre os grupos, sugerindo que não houve efeito do tipo ansiolítico e nem ansiogênico nesse parâmetro. Contudo, observamos um aumento do tempo total de autolimpeza nos grupos tratados com LPS, o que sugere um comportamento do tipo ansioso nestes animais. Esse resultado também foi mostrado em Mello et al. (2018), com

camundongos fêmeas apresentando um aumento no tempo total de autolimpeza espontânea no teste de campo aberto. No entanto, os tratamentos com colecalciferol e/ou curcumina não foram efetivos em prevenir o comportamento do tipo ansioso induzido pelo LPS neste parâmetro, nessas doses e desenho experimental. Existem estudos que demonstram a capacidade da curcumina em prevenir a ansiedade, como um estudo de Haider e colaboradores em 2015, que demonstrou que a pré-administração de curcumina (200 mg/kg/dia) por 7 dias foi capaz de prevenir o comportamento tipo ansioso induzido por estresse em ratos machos (HAIDER et al., 2015). Em relação ao colecalciferol, um estudo que suplementou a vitamina D em camundongos (1200 UI/kg) durante 8 semanas e induziu um modelo de depressão por pneumoconiose nas primeiras 4 semanas de suplementação com vitamina D, demonstrou que esta foi capaz de atenuar o comportamento tipo ansioso e depressivo nesse modelo (ZOU et al., 2022). Levando em conta que existem evidências que demonstram efeitos tipo ansiolíticos da vitamina D e da curcumina, a ausência de efeito ansiolítico destes compostos observada no presente estudo merece ser melhor explorada em experimentos futuros, bem como investigar outras doses, desenhos experimentais e a realização de outros testes comportamentais para avaliação da ansiedade.

Embora tenha sido observado um efeito ansiogênico decorrente da administração de LPS quando foram avaliados o tempo no centro do campo aberto e o tempo total de autolimpeza dos animais, esta endotoxina não foi capaz de alterar o número de comportamento de autolimpeza, a autolimpeza rostral e a autolimpeza corporal. Estudos prévios descreveram que a distribuição regional do comportamento de autolimpeza – autolimpeza rostral e autolimpeza corporal) são indicadores do comportamento de estresse em roedores (KALUEFF et al., 2016) e outro estudo sugeriu que enquanto aumenta-se o aspecto de autolimpeza corporal diante a um novo ambiente, a autolimpeza rostral é sensível às variações comportamentais de ansiedade (ESTANISLAU et al., 2013; KALUEFF et al., 2016). O nosso estudo mostrou que nenhum dos tratamentos desencadeou respostas do tipo ansiogênica ou ansiolítica nos camundongos nesse protocolo com as doses utilizadas. Entretanto, um estudo demonstra que a administração repetida de 0,5 mg/kg de LPS em ratos *Wistar* machos, sendo uma injeção administrada a cada 2 dias, totalizando 7 injeções causou uma diminuição do comportamento de escalada e o aumento da quantidade de bolos fecais, indicativos de um comportamento do tipo ansioso (SHISHKINA et al., 2020). Considerando o exposto, há a possibilidade de uma administração

crônica de LPS causar alteração dos parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade que não foram afetados no presente estudo.

Foi demonstrado em um estudo com estresse crônico que o estado físico do pelo dos animais pode sofrer danos de acordo com a injúria que ele sofre e para mensurar esse parâmetro, foi aplicado um escore para análise do estado físico do pelo dos animais (ALONSO et al., 2004). É elucidado na literatura que o desafio com LPS é um estresse imunológico, dessa forma, pode alterar diversos comportamentos e o metabolismo dos camundongos, como alterações relacionadas à um comportamento do tipo depressivo e ansioso (ZHAO et al., 2019c). Diante disso, para avaliar em um aspecto geral os camundongos, no nosso estudo foi realizada a análise através do escore para a avaliação do estado físico do pelo dos camundongos. Mostramos que o grupo tratado com o LPS apresentou uma redução significativa da qualidade do pelo quando comparado ao grupo controle, indicando que o LPS reduziu o comportamento de autocuidado dos animais. Esse efeito foi semelhante ao encontrado no estudo de Alonso et al. (2004) com o protocolo de estresse leve crônico. Os grupos tratados com LPS, colecalciferol e/ou curcumina não apresentaram alterações significativas nos escores de redução da qualidade do pelo dos camundongos. Embora estatisticamente não se tenha demonstrado que o colecalciferol e/ou a curcumina tenham protegido do dano causado ao pelo dos animais pelo LPS, o fato de que os grupos LPS e/ou curcumina e vitamina D não apresentarem redução do escore, sugere que os compostos exerceram um papel protetor nesse modelo, por não apresentarem diminuição significativa na qualidade do pelo dos animais.

Tem sido demonstrado que o desafio com LPS pode ativar principalmente a via dos receptores TLR, NF- $\kappa$ B, culminando na ativação do inflamassoma NLRP3 (PARK; LEE, 2013). Para elucidar os mecanismos envolvidos nos comportamentos do tipo antidepressivo exibido no teste de suspensão pela cauda pelo colecalciferol e pela curcumina, investigamos o papel da ativação de NLRP3 no comportamento do tipo depressivo induzido pelo LPS e da prevenção desse comportamento pelo colecalciferol e/ou curcumina no córtex pré-frontal dos camundongos. Nossos resultados mostraram que o LPS aumentou o imunoconteúdo de ASC, TXNIP, caspase-1 e IL-1 $\beta$ , indicando que esta endotoxina ativou a cascata de sinalização dessa via, que pode ser evidenciado pelo aumento do imunoconteúdo das proteínas que participam da via e principalmente através do produto final da via, o IL-1 $\beta$ . Em um estudo de Zhu e colaboradores em 2017, foi demonstrado que a administração por 28 dias de LPS causou uma ativação do inflamassoma NLRP3, proporcionando um aumento do imunoconteúdo de NLRP3,

ASC e Caspase-1 no hipocampo dos camundongos. Após o uso de um inibidor do inflamassoma NLRP3, o imunocontéudo dessas proteínas foi atenuado, aumentando ainda a expressão de Interleucina-10 (produz efeitos anti-inflamatórios) (ZHU et al., 2017). Os resultados evidenciados em nosso trabalho corroboram com os dados apresentados nesse estudo, pois demonstraram também o aumento de proteínas relacionadas à via do NLRP3 frente ao desafio com LPS, demonstrando que o modelo de inflamação produziu os efeitos esperados. Entretanto, nenhum dos tratamentos com coleccioniferol, curcumina ou com a associação, preveniu as alterações induzidas pelo LPS no imunocontéudo dessas proteínas, sugerindo que o efeito tipo antidepressivo destes compostos parece não envolver a regulação da via de ativação do inflamassoma NLRP3 no córtex pré-frontal e dentro das condições experimentais em que o experimento foi realizado. Embora o resultado observado em nosso trabalho não indique a proteção da curcumina contra os efeitos neuroinflamatórios do LPS, um estudo de Wang e colaboradores (2014) demonstrou que o pré-tratamento de camundongos com curcumina por 7 dias antes do desafio com LPS em camundongos machos preveniu o aumento da expressão de proteínas pró-inflamatórias induzidas pelo LPS relacionadas à inflamação: IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal dos camundongos (WANG et al., 2014). Um outro estudo de Jangra e colaboradores em 2016 evidenciou que o pré-tratamento com curcumina (g.o) por 7 dias antes do desafio com LPS foi capaz de prevenir a anedonia, comportamento do tipo depressivo e diminuir a expressão de IL-1 $\beta$  e a produção de nitrito no hipocampo de camundongos *Swiss* machos. Além do exposto, o tratamento com curcumina atenuou o aumento de corticosterona e a redução dos níveis de glutathiona no hipocampo promovido pelo LPS (JANGRA et al., 2016). Estudos com coleccioniferol também mostraram que esta vitamina é capaz de apresentar efeito anti-inflamatório em modelos de depressão. Em um modelo de depressão induzido por corticosterona por 21 dias, o tratamento com coleccioniferol nos últimos 7 dias reduziu o imunocontéudo de ASC, TXNIP e caspase-1 no hipocampo de camundongos (CAMARGO et al., 2020). Outro estudo demonstrou que a administração por 21 dias com coleccioniferol em camundongos que receberam LPS nos últimos 7 dias dessa administração preveniu os efeitos do LPS relacionados à inflamação, ou seja, o aumento da interleucina-6 no hipocampo de camundongos causados por este deságio imunológico (MOKHTARI-ZAER et al., 2020). Desta forma, em estudos futuros a avaliação do hipocampo dos animais seria importante para investigar se um efeito anti-inflamatório nesta estrutura pode estar subjacente ao efeito antidepressivo da curcumina e do coleccioniferol. Além

disso, outros protocolos de administração destes compostos, incluindo um aumento do tempo de suplementação poderia trazer resultados promissores quanto à atenuação da ativação do inflamassoma NLRP3 e da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Diversas vias de sinalização podem participar de um efeito tipo-depressivo em roedores, como a via do NO. O NO é produzido através do precursor L-arginina por ação catalítica das enzimas óxido nítrico sintases. Mediante um desafio por LPS, esse induz a síntese de iNOS, que conseqüentemente mediará a produção e o aumento de NO, conseqüentemente aumentando a formação de RNS e ROS. Quanto maior a expressão de iNOS, mais estimulada será a produção de NO (ABDEL-ZAHER et al., 2017; BEHESHTI et al., 2020). Em uma tentativa de elucidar o mecanismo responsável pelo comportamento tipo antidepressivo apresentado em nossos resultados comportamentais, avaliamos o imunoconteúdo da proteína iNOS. Em nosso trabalho, o LPS aumentou significativamente o imunoconteúdo de iNOS no córtex pré-frontal de camundongos em todos os grupos desafiados com LPS. O resultado encontrado em nosso estudo corrobora com achados de Li e colaboradores em 2015, que demonstraram que após 24h a administração de LPS (0,5 mg/kg i.p.), ocorreu um aumento de iNOS no córtex pré-frontal de camundongos. É bem descrito na literatura que o LPS é um estimulador da produção de iNOS, que pode levar a neuroinflamação, esta que é amplamente relacionada a transtornos de depressão (DOWLATI et al., 2010). Em um estudo de Zhao e colaboradores em (2019), camundongos receberam a administração de diferentes doses de LPS, sendo a dose de 0,75 mg/kg a mais efetiva em aumentar expressivamente a ativação de IL-1 $\beta$ , NO e iNOS no cérebro 24h após o desafio com LPS (ZHAO et al., 2019a). Corroborando com o exposto até aqui, um estudo de Gallorini e colaboradores em 2021 demonstrou que dois inibidores seletivos de iNOS foram utilizados em culturas de célula tratados com LPS, sendo esses inibidores capazes de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de inibir iNOS em monócitos, modulando a resposta inflamatória, corroborando a relação entre LPS e a expressão de iNOS (GALLORINI et al., 2021). O tratamento com coledalciferol e/ou curcumina não preveniu o aumento do imunoconteúdo de iNOS no córtex pré-frontal dos camundongos pelo LPS, sugerindo que também não parece ser bloqueando o estresse nitrosativo no córtex pré-frontal que o coledalciferol e/ou a curcumina exercem o comportamento do tipo antidepressivo demonstrado no teste comportamental nas condições experimentais usadas no presente estudo. Embora nesse estudo o coledalciferol não tenha sido capaz de prevenir as alterações causadas pelo LPS em iNOS no córtex pré-frontal, em um

estudo de Garcion e colaboradores em 1998, que utilizou ratas fêmeas, administrou LPS por via intracerebroventricular e evidenciou que os animais que receberam LPS apresentaram um aumento significativo da expressão de iNOS microglial e astrocitária 15-24 h e 72 h após a administração, respectivamente. Além disso, esse aumento foi atenuado nos animais que receberam vitamina D no hipocampo 15 e 24 h após a administração de LPS (GARCION et al., 1998). Similar ao exposto, um estudo demonstrou que a suplementação por 28 dias com curcumina atenuou o dano cognitivo causado por diazepam em ratos machos, diminuindo a expressão de iNOS no hipocampo e no córtex desses animais (SEVASTRE-BERGHIAN et al., 2017). Considerando os resultados obtidos em nosso estudo, em uma abordagem futura, a avaliação de outra estrutura encefálica como o hipocampo poderia revelar uma prevenção da colecalciferol e da curcumina frente ao desafio com o LPS.

Existem algumas limitações nesse estudo, como a avaliação de uma única estrutura encefálica, o córtex pré-frontal, e de apenas uma dose de colecalciferol e de curcumina. Em um próximo estudo, seria interessante a avaliação de outras estruturas encefálicas, principalmente o hipocampo, a fim de verificar um eventual efeito antiinflamatório do colecalciferol e da curcumina, que poderia estar associado ao efeito antidepressivo no modelo de depressão pelo LPS. Além disso, esse estudo experimental utilizou o modelo apenas em fêmeas e demonstrou-se na literatura que o comportamento e alterações no cérebro de camundongos pode ser dependente do sexo dos animais. Conforme descrito em Mello et al. (2018), a administração de LPS na dose de 0,5 mg/kg causou um aumento no tempo de imobilidade de forma significativa apenas em camundongos machos no teste de nado. Ainda, tanto machos e fêmeas apresentaram uma redução da preferência à sacarose após a exposição ao LPS, sugerindo comportamento anedônico. Outro aspecto interessante é que as fêmeas apresentaram um aumento no tempo total de autolimpeza após a exposição ao LPS, alteração que não foi observada nos machos. Portanto, no estudo de Mello et al. (2018) o LPS provocou comportamentos diferentes em machos e fêmeas, com as fêmeas apresentando anedonia e comportamento do tipo ansioso e os machos apresentando desespero comportamental e anedonia. Ambos os sexos apresentaram a expressão de proteínas pró-inflamatórias e pró-oxidativas (MELLO et al., 2018). Dessa forma, em um próximo estudo, sugere-se a investigação dos efeitos dos tratamentos com curcumina e/ou colecalciferol e do desafio com LPS em ambos os sexos, para elucidar respostas diferentes que os animais podem apresentar. Estudos demonstram que o LPS também pode desencadear respostas do tipo anedônicas em machos e fêmeas (SENS et al., 2017). Além de considerar as

diferenças entre os sexos em protocolos futuros, seria interessante avaliar o comportamento anedônico dos animais submetidos à administração de LPS e o potencial efeito protetor do colecalciferol e da curcumina.

## 7 CONCLUSÕES

O tratamento com colecalciferol, curcumina e a associação dos dois compostos por 7 dias foi capaz de reduzir *per se* o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda. Já os grupos tratados com LPS apresentaram um aumento no tempo de imobilidade dos camundongos, entretanto os grupos tratados com curcumina, colecalciferol ou a associação preveniram esse aumento do LPS, indicando efeito antidepressivo do colecalciferol e da curcumina tanto em animais controle como em animais submetidos a um desafio inflamatório.

O comportamento do tipo ansioso induzido pelo LPS inferido pelo maior tempo total de autolimpeza e redução do tempo no centro no campo aberto não foram prevenidos pelo pré-tratamento com colecalciferol ou curcumina.

Na análise do estado físico do pelo dos camundongos, o grupo tratado com LPS apresentou uma redução da qualidade do pelo, enquanto os grupos tratados com colecalciferol, curcumina ou a associação dos compostos não evidenciou essa perda, sugerindo um efeito protetor desses compostos sobre o prejuízo no autocuidado promovido pelo LPS.

As vias da ativação do NLRP3 e da síntese de óxido nítrico no córtex pré-frontal parecem não estar envolvidas no comportamento do tipo antidepressivo do colecalciferol e da curcumina nesse estudo no teste de suspensão pela cauda, sugerindo que outras vias de sinalização e/ou outra estrutura encefálica estejam envolvidas.

Diante do exposto, são necessários mais estudos para a avaliação de demais estruturas do cérebro para verificar o efeito desse protocolo em demais regiões encefálicas. Dessa forma, o mecanismo pelo qual ocorre o efeito antidepressivo da curcumina, do colecalciferol e da associação em camundongos desafiados com LPS precisa ser melhor elucidado.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-ZAHER, A. O. et al. A potential mechanism for the ameliorative effect of thymoquinone on pentylenetetrazole-induced kindling and cognitive impairments in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 553–561, 2017.

AKANA, S. F. et al. Corticosterone Exerts Site-Specific and State-Dependent Effects in Prefrontal Cortex and Amygdala on Regulation of Adrenocorticotrophic Hormone, Insulin and Fat Depots. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 13, p. 625–637, 2001.

ALAMRO, A. A. et al. Therapeutic Potential of Vitamin D and Curcumin in an In Vitro Model of Alzheimer Disease. **Journal of Central Nervous System Disease**, v. 12, p. 1–8, 2020.

ALGHAMDI, S. et al. Vitamin D Supplementation Ameliorates Severity of Major Depressive Disorder. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, n. 2, p. 230–235, 2020.

ALMEIDA, F. B.; PINNA, G.; BARROS, H. M. T. Molecular Sciences The Role of HPA Axis and Allopregnanolone on the Neurobiology of Major Depressive Disorders and PTSD. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 1–12, 2021.

ALONSO, R. et al. Blockade of CRF1 or V1b receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 3, p. 278–286, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico de Transtornos mentais: DSM-5**. 5ª Ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2015.

ANAEIGOUDARI, A. et al. Inducible nitric oxide inhibitor aminoguanidine, ameliorates deleterious effects of lipopolysaccharide on memory and long term potentiation in rat. **Life Sciences**, v. 158, p. 22–30, 2016.

ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.

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

ASADI, S. et al. Beneficial effects of nano-curcumin supplement on depression and anxiety in diabetic patients with peripheral neuropathy: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Phytotherapy Research**, p. 896–903, 2020.

ASAI, A.; MIYAZAWA, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. **Life Sciences**, v. 67, n. 23, p. 2785–2793, 2000.

ATTIA, Y. M. et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase-1 and p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by curcumin and vitamin D3 increases sensitivity to paclitaxel in breast cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, p. 1–10, 2020.

BAKISH, D. The patient with comorbid Depression and Anxiety: The unmet need. **Journal of Clinic Psychiatry**, v. 60, n. 6, p. 20–24, 1999.

BARTIK, L. et al. Curcumin: A Novel Nutritionally-Derived Ligand of the Vitamin D Receptor with Implications for Colon Cancer Chemoprevention. **Journal Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1153–1161, 2010.

BEHESHTI, F. et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in depression- and anxiety-like behaviors chronically induced by lipopolysaccharide in rats: Evidence from inflammation and oxidative stress. **Behavioural Brain Research**, v. 392, p. 1–8, 2020.

BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 281–295, 2009.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. Monoamine neurotransmitters New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 137–151, 2006.

BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuroscience**, v. 107, n. 2, p. 234–256, 2020.

BHAT, A. et al. Benefits of curcumin in brain disorders. **BioFactors**, p. 666–689, 2019.

BIESMANS, S. et al. Systematic Analysis of the Cytokine and Anhedonia Response to Peripheral Lipopolysaccharide Administration in Rats. **BioMed Research International**, v. 2, p. 1–14, 2016.

BOREL, P.; CAILLAUD, D.; CANO, N. J. Vitamin D Bioavailability: State of the Art. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 9, p. 1193–1205, 2015.

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

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

CAMARGO, A. et al. Low doses of ketamine and guanosine abrogate corticosterone-induced anxiety-related behavior, but not disturbances in the hippocampal NLRP3 inflammasome pathway. **Psychopharmacology**, v. 238, p. 2555–2568, 2021a.

CAMARGO, A. et al. The resilient phenotype elicited by ketamine against inflammatory stressors-induced depressive-like behavior is associated with NLRP3-driven signaling pathway. **Journal of Psychiatric Research**, v. 144, p. 118–128, 2021b.

CARLBERG, C. Nutrigenomics of Vitamin D. **Nutrients**, v. 11, 2019.

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

CASSEB, G. A. S.; KASTER, M. P.; RODRIGUES, A. L. S. Potential Role of Vitamin D for the Management of Depression and Anxiety. **CNS Drugs**, v. 33, n. 7, p. 619–637, 2019.

CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Neuroscience**, v. 6, p. 241–246, 2005.

CHANG, S. W.; LEE, H. C. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. **Pediatrics and Neonatology**, v. 60, n. 3, p. 237–244, 2019.

CHAROENNGAM, N.; HOLICK, M. F. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 12, p. 1–28, 2020.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Immunology**, v. 10, p. 826–837, 2010.

CHEN, M. et al. Use of curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 4, p. 742–752, 2018.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. **Physiology Reviews**, v. 96, p. 365–408, 2016.

CHRISTOFFEL, D. J.; GOLDEN, S. A.; RUSSO, S. J. Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders. **Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 535–549, 2011.

CIANCIULLI, A. et al. molecules Inflammaging and Brain: Curcumin and Its Beneficial Potential as Regulator of Microglia Activation. **Molecules**, v. 27, n. 341, p. 1–23, 2022.

COPPEN, A. J.; DOOGAN, D. P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. **Journal Clinic Psychiatry**, v. 49, p. 4–11, 1988.

CULPEPPER, L.; LAM, R. W.; MCINTYRE, R. S. Academic Highlights Cognitive Impairment in Patients With Depression: Awareness, Assessment, and Management. **Journal Clinic Psychiatry**, v. 78, n. 9, p. 1383–1394, 2017.

DA SILVA, J. L. G. et al. Co-Nanoencapsulation of Vitamin D3 and Curcumin Regulates Inflammation and Purine Metabolism in a Model of Arthritis. **Inflammation**, v. 42, n. 5, p. 1595–1610, 2019.

DA SILVA SOUZA, S. V. et al. Effects of cholecalciferol on behavior and production of reactive oxygen species in female mice subjected to corticosterone-induced model of depression. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 1, p. 111–120, 2020.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 46–57, 2008.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 247–264, 2009.

DE KONING, E. J. et al. Vitamin D supplementation for the prevention of depression and poor physical function in older persons: The D-Vitaal study, a randomized clinical trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 5, p. 1119–1130, 2019.

DE OLIVEIRA, L. R. C. et al. Calcitriol Prevents Neuroinflammation and Reduces Blood-Brain Barrier Disruption and Local Macrophage/ Microglia Activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 161, p. 1–15, 2020.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 3, p. 125–131, 2011.

DIKS, S. H.; VAN DEVENTER, S. J. H.; PEPPELENBOSCH, M. P. Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, p. 335–348, 2001.

DOME, P. et al. Natural health products, dietary minerals and over-the-counter medications as add-on therapies to antidepressants in the treatment of major depressive disorder: a review. **Brain Research Bulletin**, v. 146, p. 51–78, 2019.

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

DUDEK, K. A. et al. Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, p. 183–221, 2019.

E. I. ELLIOTT, F. S. S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2015.

ESTANISLAU, C. et al. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. **Neuroscience Research**, v. 77, n. 4, p. 187–201, 2013.

EVANSON, N. K. et al. Nongenomic Actions of Adrenal Steroids in the Central Nervous System. **Journal of neuroendocrinology**, v. 22, p. 846–861, 2010.

EYLES, D. W. et al. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 $\alpha$ -hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 29, n. 1, p. 21–30, 2005.

FAN, C. et al. Neuroprotective effects of curcumin on IL-1 $\beta$ -induced neuronal apoptosis and depression-like behaviors caused by chronic stress in rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–17, 2019.

FARGHALI, M. et al. brain sciences Review Can Brain Health Be Supported by Vitamin D-Based Supplements? A Critical Review. **Brain Sciences**, v. 10, p. 1–21, 2020.

FAVA, M. et al. Anxiety Disorders in Major Depression. **Comprehensive Psychiatry**, v. 41, n. 2, p. 97–102, 2000.

FAVA, M. et al. Clinical correlates and symptom patterns of anxious depression among patients with major depressive disorder in STAR\*D. **Psychological Medicine**, v. 34, p. 1299–1308, 2004.

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

FISCHER, A. G.; JOCHAM, G.; ULLSPERGER, M. Dual serotonergic signals: A key to understanding paradoxical effects? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 19, n. 1, p. 21–26, 2015.

FITZGERALD, K. A. et al. Regulating NLRP3 Expression NLRP3 Inflammasome Activation by Recognition and Cytokine Receptors License B Activating Pattern  $\kappa$  Cutting Edge: NF. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 787–791, 2009.

FLESHNER, M.; FRANK, M.; MAIER, S. F. Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 36–45, 2017.

FORSTERMANN, U. et al. Nitric Oxide Synthase Isozymes Characterization, Purification, Molecular Cloning, and Functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 1121–1131, 1994.

FRAGA, D. B. et al. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 100, p. 16–23, 2018.

FREIS, E. D. MENTAL DEPRESSION IN HYPERTENSIVE PATIENTS TREATED FOR LONG PERIODS WITH LARGE DOSES OF RESERPINE. **The New England Journal of Medicine**, v. 251, n. 25, p. 1006–1008, 1954.

GALLORINI, M. et al. Selective Inhibitors of the Inducible Nitric Oxide Synthase as Modulators of Cell Responses in LPS-Stimulated Human Monocytes. **Molecules**, v. 26, n. 4419, p. 1–12, 2021.

GARCION, E. et al. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase During Rat Brain Inflammation: Regulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. **Glia**, v. 22, p. 282–294, 1998.

GIMSA, U.; AVRION MITCHISON, N.; BRUNNER-WEINZIERL, M. C. Immune Privilege as an Intrinsic CNS Property: Astrocytes Protect the CNS against T-Cell-Mediated Neuroinflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 11, 2013.

GORMAN, J. M. COMORBID DEPRESSION AND ANXIETY SPECTRUM DISORDERS. **Depression and Anxiety**, v. 4, p. 160–168, 1996.

GRUDET, C. et al. Vitamin D and inflammation in major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 267, p. 33–41, 15 abr. 2020.

HAIDER, S. et al. Pretreatment with curcumin attenuates anxiety while strengthens memory performance after one short stress experience in male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 115, p. 1–8, 2015.

HAUSSLER, M. R. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D and Klotho: A Tale of Two Renal Hormones Coming of Age. **Vitamins and Hormones**, v. 100, p. 165–230, 2016.

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

HEBA, G. et al. The Time Course of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Inducible Nitric Oxide Synthase and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in an Experimental Model of Chronic Myocardial Infarction in Rats. **Journal of Vascular Research**, v. 38, p. 288–300, 2001.

HEMSHEKHAR, M. et al. A bioavailable form of curcumin, in combination with vitamin-D- and omega-3-enriched diet, modifies disease onset and outcomes in a murine model of collagen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 23, p. 39, 2021.

HIKA, B.; KHALILI, Y. AL. Neuronatomy, Prefrontal Association Cortex. **StatPearls Publishing**, 2021.

HOLICK, M. F. Vitamin D: A D-Lightful health perspective. **Nutrition Reviews**, v. 66, p. 182–194, 2008.

HOLLIS, B. W. et al. Effect of Age on the Intestinal Absorption of Vitamin D<sub>3</sub>-Palmitate and Nonesterified Vitamin D<sub>3</sub> in the Term Human Infant\*. **Journal of Clinical Endocrinology and metabolism**, v. 81, n. 4, p. 1385–1388, 1996.

HUANG, Y.-N. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, 2015.

IONESCU, D. F.; PAPAKOSTAS, G. I. Experimental medication treatment approaches for depression. **Translational Psychiatry**, v. 1, p. 1–8, 2017.

ISMAEL, S. et al. Thioredoxin interacting protein regulates age-associated neuroinflammation. **Neurobiology of Disease**, v. 156, p. 105399, 2021.

ISOMETSÄ, E. Suicidal Behaviour in Mood Disorders-Who, When, and Why? **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 120–130, 2014.

IWATA, M.; OTA, K. T.; DUMAN, R. S. The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 105–114, 2013.

JABCZYK, M. et al. Curcumin in Metabolic Health and Disease. **Nutrients**, v. 13, n. 4440, p. 1–12, 2021.

JANGRA, A. et al. Piperine Augments the Protective Effect of Curcumin Against Lipopolysaccharide-Induced Neurobehavioral and Neurochemical Deficits in Mice. **Inflammation**, v. 39, 2016.

JIA, X.; GAO, Z.; HU, H. Microglia in depression: current perspectives. **Science China**, v. 64, p. 911–925, 2020.

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

JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity 1-4 Glenville Jones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 582s–6s, 2008.

JUNG, K. K. et al. Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated primary microglia. **Life Sciences**, v. 79, n. 21, p. 2022–2031, 2006.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 189–201, 2004.

KALUEFF, A. V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, p. 45–59, 2016.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 508, n. 1–3, p. 147–153, 2005.

KAUFMANN, F. N. et al. Curcumin in depressive disorders: An overview of potential mechanisms, preclinical and clinical findings. **European Journal of Pharmacology**, v. 784, p. 192–198, 2016.

KAUFMANN, F. N. et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 64, p. 367–383, 2017.

KAVIANI, M. et al. Effects of vitamin D supplementation on depression and some involved neurotransmitters. **Journal of Affective Disorders**, v. 269, p. 28–35, 2020.

KAWAURA, A. et al. Antidepressant-like effect of 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on mice in the forced swimming test. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 63, n. 1, p. 81–84, 2017.

KELLEY, N. et al. Molecular Sciences The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–24, 2019.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 461–553, 2011.

KHORAMINYA, N. et al. Therapeutic effects of vitamin D as adjunctive therapy to fluoxetine in patients with major depressive disorder. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 47, n. 3, p. 271–275, 2012.

KIM, Y. K. 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.

KRAKOWSKI, A. J. Treatment of Depression with Imipramine (Tofranil®) and Imipramine Combined with Promazine. **The Journal of New Drugs**, v. 2, n. 1, p. 56–62, 1962.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008.

LACOSTA, S.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. **Brain Research**, v. 818, n. 2, p. 291–303, 1999.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 137–161, 2012.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, 2014.

LI, Y. C. et al. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 435–449, 2009.

LI, Z. et al. Major Depressive Disorder: Advances in Neuroscience Research and Translational Applications. **Neuroscience**, v. 37, n. (6), p. 863–880, 2021.

LIAN, L. et al. Antidepressant-like effects of a novel curcumin derivative J147: Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 506–513, 2018.

LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 957–967, 2017.

LOPES, P. C. LPS and neuroinflammation: a matter of timing. **Inflammopharmacology**, v. 24, p. 291–293, 2016.

LOPRESTI, A. L. et al. Curcumin for the treatment of major depression: A randomised, double-blind, placebo controlled study. **Journal of Affective Disorders**, v. 167, p. 368–375, 2014.

LOPRESTI, A. L. Curcumin for neuropsychiatric disorders: A review of in vitro, animal and human studies. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 3, p. 287–302, 2017.

LOPRESTI, A. L. Potential Role of Curcumin for the Treatment of Major Depressive Disorder. **CNS Drugs**, v. 36, p. 123–141, 2022.

LOPRESTI, A. L.; DRUMMOND, P. D. Efficacy of curcumin, and a saffron/curcumin combination for the treatment of major depression: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Affective Disorders**, v. 207, p. 188–196, 2017.

LOPRESTI, A. L.; HOOD, S. D.; DRUMMOND, P. D. Multiple antidepressant potential modes of action of curcumin: A review of its anti-inflammatory, monoaminergic, antioxidant, immune-modulating and neuroprotective effects. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 12, p. 1512–1524, 2012.

LUBBAD, A.; ORIOWO, A. M. A.; KHAN, A. I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 322, p. 127–135, 2009.

MÁČOVÁ, L.; BIČÍKOVÁ, M. Vitamin D: Current Challenges between the Laboratory and Clinical Practice. **Nutrients**, v. 13, 2021.

MANTZOROU, M. et al. Effects of curcumin consumption on human chronic diseases: A narrative review of the most recent clinical data. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 6, p. 957–975, 2018.

MARTIN-SUBERO, M. et al. Comorbidity between depression and inflammatory bowel disease explained by immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress; tryptophan catabolite; and gut-brain pathways. **CNS Spectrums**, v. 21, p. 184–198, 2015.

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

MEMARZIA, A. et al. Experimental and clinical reports on anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Curcuma longa* and curcumin, an updated and comprehensive review. **BioFactors**, v. 47, n. 3, p. 311–350, 2021.

MEZA-MEZA, M. R.; RUIZ-BALLESTEROS, A. I.; DE LA CRUZ-MOSSO, U. Functional effects of vitamin D: From nutrient to immunomodulator. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 11, p. 3042–3062, 2020.

MILANESCHI, Y. et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D and Depressive Symptoms in Older Women and Men. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3225–3233, 2010.

MILANESCHI, Y. et al. The association between low vitamin D and depressive disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 4, p. 444–451, 2014.

MILLAN, M. J.; RIVET, J. M.; GOBERT, A. The frontal cortex as a network hub controlling mood and cognition: Probing its neurochemical substrates for improved therapy of psychiatric and neurological disorders. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 11, p. 1099–1128, 2016.

MOHAMMAD, S.; THIEMERMANN, C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2021.

MOKHTARI-ZAER, A. et al. Vitamin D3 attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress. **Life Sciences**, v. 253, p. 117703, 2020.

MORETTI, J.; MAGARIAN BLANDER, J. Increasing complexity of NLRP3 inflammasome regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 109, p. 561–571, 2020.

NAIR, R.; MASEEH, A. Vitamin D: The sunshine vitamin. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 2, p. 118–126, 2012.

NEIS, V. B. et al. Involvement of serotonergic neurotransmission in the antidepressant-like effect elicited by cholecalciferol in the chronic unpredictable stress model in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, p. 1597–1608, 2022.

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

NOORAFSHAN, A. et al. Sertraline and curcumin prevent stress-induced morphological changes of dendrites and neurons in the medial prefrontal cortex of rats. **Folia Neuropathologica**, v. 53, n. 1, p. 69–79, 2015.

NUÑEZ, N. A. et al. Augmentation strategies for treatment resistant major depression: A systematic review and network meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 302, p. 385–400, 2022.

O'CONNOR, J. C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511–522, 2009.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. Mdd, p. 1–21, 2016.

OZAWA, H. et al. Curcumin  $\beta$ -D-Glucuronide Plays an Important Role to Keep High Levels of Free-Form Curcumin in the Blood. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 1515–1524, 2017.

PANAHI, Y. et al. Investigation of the Efficacy of Adjunctive Therapy with Bioavailability-Boosted Curcuminoids in Major Depressive Disorder. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 17–21, 2014.

PANDUR, E. et al. Effect of Inflammatory Mediators Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid on Iron Metabolism of Differentiated SH-SY5Y Cells Alters in the Presence of BV-2 Microglia. **International Journal of Molecular Sciences Article**, 2018.

PAPADIMITRIOU, A.; PRIFTIS, K. N. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, p. 265–271, 2009.

PAPAKOSTAS, G. I.; IONESCU, D. F. Towards new mechanisms: An update on therapeutics for treatment-resistant major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 10, p. 1142–1150, 2015.

PARK, B. S.; LEE, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, p. 45, 2013.

PEREZ-CABALLERO, L. et al. Monoaminergic system and depression. **Cell and Tissue Research**, v. 377, p. 107–113, 2019.

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

PFOTENHAUER, K. M.; SHUBROOK, J. H. Vitamin D Deficiency, Its Role in Health and Disease, and Current Supplementation Recommendations. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 117, n. 5, p. 301–305, 2017.

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 2019.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

QIU, J. et al. Lipopolysaccharide-Induced Depression-Like Behaviors Is Ameliorated by Sodium Butyrate via Inhibiting Neuroinflammation and Oxido-Nitrosative Stress. **Pharmacology**, v. 105, n. 9–10, p. 550–560, 2020.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. LIPOPOLYSACCHARIDE ENDOTOXINS. **Annual Review Biochemistry**, v. 71, p. 635–700, 2002.

RODRIGUES, A. L. S. et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology and Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 150–156, 1996.

ROISER, J. P.; ELLIOTT, R.; SAHAKIAN, B. J. Cognitive Mechanisms of Treatment in Depression. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v. 37, p. 117–136, 2011.

RUBAB, S. et al. Enhanced neuroprotective and antidepressant activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers in lipopolysaccharide-induced depression and anxiety rat model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 603, p. 120670, 2021.

RUIZ, N. A. L. et al. Inflammatory Process and Immune System in Major Depressive Disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 46–53, 2022.

SAIED, N. M. et al. Neuromodulatory effect of curcumin on catecholamine systems and inflammatory cytokines in ovariectomized female rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 3, p. 337–346, 2021.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 223–229, 2017.

SCHILDKRAUT, J. J. THE CATECHOLAMINE HYPOTHESIS OF AFFECTIVE DISORDERS: A REVIEW OF SUPPORTING EVIDENCE. **American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–522, 1965.

SEEDAT, S. et al. Cross-National Associations Between Gender and Mental Disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 785–795, 2009.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, p. 52434, 2015.

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

SEPEHRMANESH, Z. et al. Vitamin D supplementation affects the beck depression inventory, insulin resistance, and biomarkers of oxidative stress in patients with major depressive disorder: A randomized, controlled clinical trial. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 2, p. 243–248, 2016.

SEVASTRE-BERGHIAN, A. C. et al. Curcumin Reverses the Diazepam-Induced Cognitive Impairment by Modulation of Oxidative Stress and ERK 1/2/NF- $\kappa$ B Pathway in Brain. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–16, 2017.

SHEN, L.-R. et al. Curcumin and Aging. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 133–140, 2013.

SHISHKINA, G. T. et al. Anxiogenic-like effect of chronic lipopolysaccharide is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 9 in the rat amygdala. **Stress**, v. 23, n. 6, p. 708–714, 2020.

SILIPO, A. et al. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. **Glycobiology**, v. 20, n. 4, p. 406–419, 2010.

SINGHAL, G. et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 1–13, 2014.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Medical Hypotheses**, v. 35, n. 4, p. 298–306, 1991.

SORRELLS, S. F.; SAPOLSKY, R. M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 3, p. 259–272, 2007.

STEIN, M. B. et al. Social Anxiety Disorder and the Risk of Depression A Prospective Community Study of Adolescents and Young Adults. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, p. 251–256, 2001.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

SU, J. et al. Saikosaponin-d attenuated lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors via inhibiting microglia activation and neuroinflammation. **International Immunopharmacology**, v. 80, 2020.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumin, the golden powder from turmeric: Insights into chemical and biological activities. **Quimica Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

TILLER, J. W. G. Depression and its comorbidities Clinical focus. **The Medical Journal of Australia**, v. 4, p. 28–32, 2012.

TOMREN, M. A. et al. Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 27–34, 2007.

TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151–171, 2021.

TSIARAS, W. G.; WEINSTOCK, M. A. Factors influencing vitamin d status. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 91, n. 2, p. 115–124, 2011.

TSUBAKI, H.; TOOYAMA, I.; WALKER, D. G. Molecular Sciences Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) with Focus on Brain and Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1–24, 2020.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S24–S32, 2010.

UPADHYAY, R. K. Transendothelial Transport and Its Role in Therapeutics. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, n. August, p. 1–39, 2014.

VAN ERP, A. M. M. et al. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: Handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. **Behavioural Brain Research**, v. 65, n. 1, p. 47–55, 1994.

VASILEVA, L. V. et al. Antidepressant-like effect of salidroside and curcumin on the immunoreactivity of rats subjected to a chronic mild stress model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 604–611, 2018.

VIETH, R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 69, p. 842–856, 1999.

WALSH, J. G.; MURUVE, D. A.; POWER, C. Inflammasomes in the CNS. **Neuroscience**, v. 15, p. 84–97, 2014.

WANG, Y.-J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 1867–1876, 1997.

WANG, Z. et al. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Behavioural Brain Research**, v. 274, p. 282–290, 2014.

WONG, M. et al. Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition. **Molecular Psychiatry**, v. 21, p. 797–805, 2016.

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

WU, S.; YIN, Y.; DU, · LONGFEI. Blood-Brain Barrier Dysfunction in the Pathogenesis of Major Depressive Disorder. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2021.

WU, Z. et al. Brief postpartum separation from offspring promotes resilience to lipopolysaccharide challenge-induced anxiety and depressive-like behaviors and inhibits neuroinflammation in C57BL/6J dams. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 95, p. 190–202, 2021.

XU, Y. et al. The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 518, n. 1, p. 40–46, 2005.

YU, J. J. et al. Chronic Supplementation of Curcumin Enhances the Efficacy of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 4, p. 406–410, 2015.

YUAN, H. et al. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

ZHANG, G. et al. LPS-induced iNOS expression in N9 microglial cells is suppressed by geniposide via ERK, p38 and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 3, p. 561–568, 2012a.

ZHANG, L. et al. Curcumin produces antidepressant effects via activating MAPK/ERK-dependent brain-derived neurotrophic factor expression in the amygdala of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 1, p. 67–72, 2012b.

ZHANG, M. et al. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) as a target for Alzheimer's disease: flavonoids and phenols. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 1317–1329, 2021.

ZHANG, W. YUAN et al. Curcumin relieves depressive-like behaviors via inhibition of the NLRP3 inflammasome and kynurenine pathway in rats suffering from chronic unpredictable mild stress. **International Immunopharmacology**, v. 67, p. 138–144, 2019.

ZHAO, F. et al. Curcumin and its major metabolites inhibit the inflammatory response induced by lipopolysaccharide: Translocation of nuclear factor- $\kappa$ B as potential target. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 4, p. 3087–3093, 2015.

ZHAO, J. et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 5790, p. 1–12, 2019a.

ZHAO, J. et al. Curcumin attenuates murine lupus via inhibiting NLRP3 inflammasome. **International Immunopharmacology**, v. 69, p. 213–216, 2019b.

ZHAO, X. et al. Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 494–502, 2019c.

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

ZHOU, H.; BEEVERS, C. S.; HUANG, S. Targets of curcumin. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 3, p. 332–347, 2011.

ZHOU, R. et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136–141, 2009.

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

ZOU, Y. et al. Vitamin D3 suppresses astrocyte activation and ameliorates coal dust-induced mood disorders in mice. **Journal of Affective Disorders**, v. 303, p. 138–147, 2022.