

UNIVERSIDADE PAULISTA

**EFEITOS DO ZINCO E DO PARACETAMOL NO COMPORTAMENTO
TIPO-DEPRESSIVO DE RATOS INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, sob orientação do Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

DANILO CABRAL

SÃO PAULO

2017

DANILO CABRAL

**EFEITOS DO ZINCO E DO PARACETAMOL NO COMPORTAMENTO
TIPO-DEPRESSIVO DE RATOS INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

SÃO PAULO

2017

Cabral, Danilo.

Efeitos do zinco e do paracetamol no comportamento tipo-depressivo de ratos induzido por lipopolissacarídeo / Danilo Cabral. - 2017.

74 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

DANILO CABRAL

**EFEITOS DO ZINCO E DO PARACETAMOL NO COMPORTAMENTO
TIPO-DEPRESSIVO DE RATOS INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Patologia Ambiental e Experimental
da Universidade Paulista - UNIP,
para obtenção do título de Mestre em
Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado em : ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Este é um projeto de Mestrado do Danilo Cabral, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Agradeço a Deus, por tudo que faz e tem feito na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, pela dedicação e apoio a qual teve comigo durante todas as etapas do mestrado.

À minha família pelo apoio, e sempre esta do meu lado me ajudando e dando força.

À Universidade Paulista, que disponibilizou suas instalações, laboratórios e estrutura geral, onde os experimentos foram realizados. Também aos funcionários da Universidade, em especial ao técnico Wilton.

À Marcella C. Galvão, ao Renan Monteiro, estudantes de IC, pela colaboração durante os experimentos comportamentais.

À Dra. Nicolle Queiroz-Hazarbassanov, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) pelo auxílio nas análises por ELISA das amostras de plasma.

Ao Pietro Domingues Dossa, Maria F. M. Martins e Prof. Dr. Eduardo F. Bondan da Universidade Paulista e Universidade Cruzeiro do Sul pelo auxílio nas análises por imuno-histoquímica das amostras de encéfalo.

Aos ratos, por meio dos quais se puderam obter os dados deste trabalho. Eles permitiram o avanço de mais um degrau no conhecimento da ciência.

À FAPESP (processo número 2015/02742-0) pelo apoio financeiro.

À CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

A depressão pode ser desencadeada por fatores imunes/inflamatórios e possui alta comorbidade com o comportamento doentio e a ansiedade. Os medicamentos antidepressivos existentes apresentam eficácia limitada. O zinco e o paracetamol, além de interferirem com o sistema imune, já demonstraram efeito benéfico no tratamento da depressão, quando administrados concomitantemente a doses subefetivas dos antidepressivos. O objetivo do estudo foi utilizar o zinco e/ou paracetamol como tratamento do comportamento doentio, da ansiedade e do comportamento tipo-depressivo em ratos. Induzimos o comportamento doentio e tipo-depressivo em ratos Wistar adultos com administrações repetidas de lipopolissacarídeo (LPS, endotoxina bacteriana gram-negativa). Os ratos receberam zinco e/ou paracetamol por três dias consecutivos. Avaliações: (1) comportamento doentio (diariamente pelo peso corporal e atividade geral em campo aberto); (2) ansiedade (teste claro-escuro); (3) comportamento tipo-depressivo/antidepressivo (teste do nado forçado); (4) corticosterona e interferon (IFN)-gama plasmáticos; e (5) proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e tirosina hidroxilase (TH) encefálicos. Avaliações 4 e 5 são biomarcadores ligados ao sistema neuroimune e/ou a depressão, para entendimento dos mecanismos envolvidos. O LPS induziu o comportamento doentio e o comportamento tipo-depressivo, assim como elevou os níveis de IFN-gama e a expressão de GFAP nos ratos. O zinco preveniu tanto os prejuízos comportamentais quanto os bioquímicos. Embora o tratamento com paracetamol e a associação zinco+paracetamol tenham revelado aparente efeito benéfico na melhora de alguns parâmetros, não se pode afirmar este ser um efeito robusto. A ansiedade, corticosterona e TH parecem não estarem relacionadas às demais alterações comportamentais e neuroimunes. Assim, pode-se destacar o efeito benéfico do sulfato de zinco no tratamento do comportamento doentio e tipo-depressivo, sem o auxílio de antidepressivos. Além disso, os achados relativos ao IFN-gama e GFAP revelaram sua relação com a gênese do comportamento doentio e da depressão e que os tratamentos que tenham a capacidade de interferir com os níveis de IFN-gama e a expressão de GFAP podem auxiliar na melhora dos sintomas desses transtornos.

Palavras-Chave: Depressão; Ansiedade; LPS; Comportamento doentio.

ABSTRACT

Depression can be triggered by immune/inflammatory factors and presents high comorbidity with sickness behavior and anxiety. Antidepressant drugs are considered to be of limited effectiveness. Zinc and paracetamol interfere with immune system and have demonstrated a beneficial effect on depression treatment when administered concomitant with subeffective doses of antidepressant drugs. The objective of this study was to use zinc and/or paracetamol as treatment of sickness behavior, anxiety, and depressive-like behavior in rats. We induced sickness behavior and depressive-like behavior in adult Wistar rats with repetitive lipopolysaccharide (LPS, gram-negative bacteria endotoxin) administrations. Rats received zinc and/or paracetamol for three consecutive days. Evaluations: (1) sickness behavior (daily body weight and open field general activity); (2) anxiety (light-dark test); (3) depressive-like/antidepressant behavior (forced swim test); (4) plasmatic corticosterone and interferon (IFN)-gamma levels; and (5) glial fibrillary acidic protein (GFAP) and tyrosine hydroxylase (TH) brain expression. Evaluations 4 and 5 are biomarkers linked with neuroimmune system and/or depression, evaluated to understand the mechanisms involved. LPS induced sickness behavior and depressive-like behavior, as well as elevated IFN-gamma levels and GFAP expression. Zinc prevented both behavioral and biochemistry impairments. Although paracetamol and zinc+paracetamol association induced apparent beneficial effect ameliorating some parameters, this was not a robust effect. Anxiety, corticosterone, and TH seem not to be related with the other behavioral and neuroimmune changes. Concluding, sulfate zinc treatment was beneficial for sickness behavior and depressive-like behavior, without antidepressant concomitant administration. IFN-gamma and GFAP data revealed their relation with sickness behavior and depressive-like behavior genesis. Moreover, treatments which interfere with IFN-gamma levels and GFAP expression may be considered to treat symptoms of these disorders.

Key-words: Depression; Anxiety; LPS; Sickness behavior.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
1.1 Justificativa.....	11
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Tratamentos, grupos e delineamento experimental.....	16
3.3 Avaliação do comportamento doentio pela atividade geral em campo aberto e peso corporal.....	21
3.4 Avaliação dos níveis de ansiedade pelo teste claro-escuro.....	22
3.5 Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo teste do nado forçado.....	22
3.6 Corticosterona e IFN-gama	23
3.7 GFAP e TH.....	24
3.8 Análise estatística (forma de análise dos resultados).....	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Avaliação do comportamento doentio pela atividade geral em campo aberto e peso corporal.....	27
4.2 Avaliação dos níveis de ansiedade pelo teste claro-escuro.....	35
4.3 Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo teste do nado forçado.....	39
4.4 Corticosterona e IFN-gama.....	42
4.5 GFAP e TH.....	45
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	74

1 INTRODUÇÃO

A depressão caracteriza-se pela perda de prazer nas atividades diárias, anedonia, apatia, diminuição da capacidade de raciocinar adequadamente, de se concentrar, de tomar decisões, lentidão, fadiga, sensação de fraqueza, alterações do sono (insônia ou hipersonolência), alterações do apetite (diminuição ou aumento), redução do interesse sexual, retraimento social, ideação suicida e prejuízo funcional significativo, incluindo piora do desempenho escolar e ausências no trabalho, considerada como uma das principais causas de afastamentos e desemprego em todo o mundo (THOMPSON et al., 2001; CARROLL; CASSIDY; COTE, 2003). Um dado alarmante é que de 40 a 60% dos suicídios têm causa depressiva (CLARK, 1990; LONNQVIST et al., 1995).

É estimado que mais de 15% dos adultos vão experimentar pelo menos um episódio de depressão em algum momento da vida, e as mulheres mais afetadas que os homens (20% *versus* 10%) (MURRAY; LOPEZ, 1997; PARKER; BROTHIE, 2010). Os custos relacionados a essa desordem representa um encargo econômico de dezenas de bilhões de dólares por ano (JENKINS; GOLDNER, 2012). Portanto, somando a alta incidência desta desordem de humor, dela ser uma das principais causas de afastamentos, desemprego e suicídio, e os altos custos relacionados ao seu tratamento, a depressão vem sendo considerada por muitos como o mal do século 21.

Infelizmente, pouco se sabe sobre a etiologia e patofisiologia da depressão, podendo ser considerada uma desordem de causas multifatoriais, incluindo fatores genéticos, eventos estressores (como perdas de entes próximos), doenças, desequilíbrio hormonal, medicamentos, drogas de abuso, bem como hipóteses monoaminérgicas ligadas a alterações de neurotransmissores como serotonina e noradrenalina (CARROLL; CASSIDY; COTE, 2003; COLMAN; ATAULLAHJAN, 2010). A hipótese monoaminérgica é aceita e reconhecida há muitos anos, inclusive tendo muito dos antidepressivos prescritos atualmente baseados nela; porém, falha em explicar/tratar muitos dos aspectos da depressão, abrindo a possibilidade de investigação de causas adicionais (RAEDLER, 2011).

Outras hipóteses que vêm ganhando força nos últimos tempos incluem ativações imunes/inflamatórias como indutoras da depressão (SMITH, 1991;

MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Smith (1991) propôs a teoria do macrófago da depressão, que afirma que a liberação excessiva de interleucina (IL)-1, entre outros produtos de macrófagos estariam envolvidos na patogênese da depressão. Alguns pacientes diagnosticados com depressão também apresentam aumento nos níveis de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF)-alfa e IL-6 no sangue (DOWLATI et al., 2010). Diversos pacientes que foram tratados com medicamentos imunoestimulantes, como interferon (IFN)-alfa, como terapia contra hepatite C, ou câncer, também desenvolveram depressão (LOFTIS; HAUSER, 2004). Mais ainda, mesmo doses baixas de lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina bacteriana, administrada a pacientes humanos voluntários, são capazes de aumentar níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e induzir anedonia, que é uma das principais características da depressão (EISENBERGER et al., 2010). O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas que, quando em contato com o organismo animal, mimetiza uma infecção bacteriana (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009). Essa endotoxina induz no organismo a síntese e liberação de IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa, além de ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), resultando em aumento de glicocorticoides na corrente sanguínea periférica (ADEREM; ULEVITCH, 2000; HAVA et al., 2006; KIRSTEN et al., 2013).

Portanto, interferências neuroimunes parecem representar um importante papel na gênese da depressão. Baseado nessas hipóteses, muitos medicamentos e diversas substâncias que interferem com o sistema imune e suas relações bidirecionais com o sistema nervoso central têm sido testados para o tratamento da depressão; exemplo são os anti-inflamatórios (RAEDLER, 2011). O celecoxibe, um inibidor ciclooxigenase 2 (COX-2), tem a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. O celecoxibe melhorou as respostas antidepressivas em pacientes depressivos que já eram tratados com o antidepressivo reboxetina (inibidor seletivo da recaptação da noradrenalina) (MULLER et al., 2006). Resultados semelhantes foram encontrados com a combinação de celecoxibe com fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação da serotonina) (AKHONDZADEH et al., 2009). Outro exemplo interessante é o uso de inibidores de TNF-alfa (como etanercepte e infliximabe), que reduziram sintomas depressivos em pacientes com psoríase e doença de Crohn e têm sido examinados como potenciais tratamentos para pacientes depressivos (PERSOONS et al., 2005; TYRING et al., 2006).

A ansiedade é caracterizada por um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, tensão ou desconforto derivado de antecipação de perigo, de algo desconhecido ou estranho (SWEDO; LEONARD; ALLEN, 1994; ALLEN; LEONARD; SWEDO, 1995). Diversos estudos apontam para uma alta comorbidade entre a ansiedade e a depressão (KOVACS; DEVLIN, 1998). Por exemplo, crianças e adolescentes diagnosticados com ansiedade muitas vezes precedem para quadros depressivos (KOVACS; DEVLIN, 1998; KIRCANSKI et al., 2016). Outro exemplo está na associação entre sintomas ansiosos e a depressão unipolar (FREEMAN; FREEMAN; MCELROY, 2002). Já existem evidências de que esses dois transtornos dividem o mesmo substrato neurobiológico, envolvendo neurotransmissores como a serotonina e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (FREEMAN; FREEMAN; MCELROY, 2002; KIRCANSKI et al., 2016).

O comportamento doentio é considerado como um conjunto organizado de alterações adaptativas neuroimunes e comportamentais, temporárias e específicas em resposta a processos infecciosos/inflamatórios, no intuito de otimizar o processo de cura, dentre outras estratégias comportamentais benéficas ao hospedeiro e a sua colônia (HART, 1988; KENT et al., 1992). Destacam-se entre os diversos sintomas presentes no comportamento doentio a febre, letargia, prostração, apatia, anorexia, sonilência, hipofagia, a diminuição da atividade exploratória, dos contatos sociais e da atividade sexual, e prejuízo na memória e aprendizado (LARSON; DUNN, 2001; DANTZER; KELLEY, 2007). O comportamento doentio e a depressão podem apresentar alta correlação, uma vez que o mesmo gatilho imune, como, por exemplo, o LPS, pode induzir ambos distúrbios (YIRMIYA, 1996; FRENOIS et al., 2007; DANTZER et al., 2008; BAY-RICHTER et al., 2011).

O zinco é um elemento químico essencial para o organismo, atuando em diversos processos fisiológicos, como proliferação e diferenciação celular, crescimento e desenvolvimento, no metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, síntese e degradação de carboidratos e na atividade de inúmeras enzimas, como, por exemplo, superóxido dismutase e citocromo c oxidase (MARET; SANDSTEAD, 2006; CHAFFEE; KING, 2012). O zinco também tem papel fundamental nos sistemas nervoso e imune, participando da imunidade inata e adaptativa (TUERK; FAZEL, 2009; MAYWALD; RINK, 2014).

O paracetamol originalmente é prescrito pelo seu potencial analgésico e ação antipirética, e classicamente conhecido por apresentar baixa atividade anti-inflamatória. Porém, estudos apontam para efeito similar àqueles encontrados após a administração de inibidores de COX-2, que inibem a síntese de prostaglandinas (GRAHAM; SCOTT, 2005). Um dado interessante a respeito do uso do paracetamol, que motiva ainda mais sua pesquisa para outros fins, é que, a menos que administrado em doses elevadas, durante períodos prolongados, ou associado ao álcool, por exemplo, é considerado como não causador de efeitos adversos (SHEEN et al., 2002).

Os IFNs são um grupo de proteínas que possuem uma importante atividade antiviral inata, provavelmente devido a propriedades reguladoras de crescimento, à inibição da angiogênese, à regulação da diferenciação celular e ao aumento da expressão de antígenos (SHIFFMAN, 2001). Os IFNs têm efeitos diversos sobre células imunes inatas e adaptativas durante a infecção com vírus, bactérias, parasitas e fungos, direta e indiretamente através da indução de outros mediadores (MCNAB et al., 2015). É sabida da relação dos IFNs com a depressão. Por exemplo, administração de IFN-alfa induz comportamentos tipo-depressivos em roedores (MYINT et al., 2009). Em pacientes humanos fenômenos semelhantes acontecem, em que a imunoterapia com IFN-alfa induz a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e menor disponibilidade de triptofano no plasma (WICHES et al., 2006).

Considerando a relação da depressão com fatores neuroimunes e sua comorbidade com a ansiedade e o comportamento doentio, o presente estudo utilizou o zinco e o paracetamol como tratamento destes distúrbios sem o auxílio de antidepressivos.

1.1 Justificativa

Estudos clínicos revelaram que muitos pacientes depressivos apresentam hipozinquemia sérica, inclusive com correlação negativa entre a concentração de zinco e a severidade do quadro (MAES et al., 1994; NOWAK; SZEWCZYK; PILC, 2005). Além disso, a hipozinquemia pode ser normalizada após tratamento com antidepressivos (MCLOUGHLIN; HODGE, 1990; MAES et al., 1997). A associação de zinco com antidepressivos aumentou a eficiência dos antidepressivos em

pacientes com depressão unipolar (NOWAK et al., 2003; SIWEK et al., 2009). Existem indícios que a suplementação com zinco não só contribui para a melhora do quadro depressivo, mas também com relação aos níveis de ansiedade em pacientes com anorexia nervosa (KATZ et al., 1987).

Em modelos animais os resultados são similares. Por exemplo, em camundongos foi demonstrado que tratamento com nanopartículas de óxido de zinco melhorou a memória espacial, além de melhorias eletrofisiológicas, quando estes apresentavam comportamentos tipo-depressivos, comparadas aos animais que receberam somente LPS (XIE et al., 2012). Além disso, doses subefetivas de zinco administradas em combinação com doses subefetivas de antidepressivos (como imipramina) resultaram em efeitos tipo-antidepressivos no teste do nado forçado, da suspensão pela cauda e no modelo de estresse crônico imprevisível em ratos e camundongos (CIESLIK et al., 2007; CUNHA et al., 2008; SZEWCZYK et al., 2009).

Embora já esteja bem estabelecida a relação da hipozinquemia com muitos pacientes depressivos, diversos estudos revelaram que a administração de zinco sem estar associada a um antidepressivo pode não ser capaz de melhorar quadros depressivos. Um exemplo é o estudo conduzido em mais de 600 crianças com a suplementação com óxido de zinco ou placebo durante seis meses. Nesse caso, não foram encontradas diferenças nos quadros depressivos das crianças entre os dois grupos (DIGIROLAMO et al., 2010). Outro exemplo mostra efeito benéfico do zinco hidroaspartato no nado forçado de camundongos apenas na dose mais alta, de 30 mg/kg, sem efeitos nas doses de 5, 10 e 15 mg/kg, comparado aos valores do grupo controle (SZEWCZYK et al., 2002). Por outro lado, esse estudo mostra que mesmo as doses ineficientes de zinco hidroaspartato (como 10 mg/kg), quando combinadas com subdoses de antidepressivos, como imipramina e citalopram apresentam resultados benéficos (SZEWCZYK et al., 2002).

Foi delineado como primeiro objetivo deste trabalho avaliar o eventual efeito antidepressivo do zinco em um modelo experimental de depressão em ratos induzido por LPS. Não existem estudos dos efeitos do sulfato de zinco com o modelo de indução de comportamentos tipo-depressivos aqui proposto e que serão explicados mais a frente. Especificamente, o zinco pode interferir no mecanismo de ação do LPS, pois as citocinas produzidas a partir da exposição do organismo ao

LPS induzem a produção da metalotioneína (MT), uma proteína ligante que sequestra o zinco, resultando em hipozinquemia (COYLE et al., 2009). Portanto, o tratamento com zinco tem o potencial de reverter os danos causados pelo LPS.

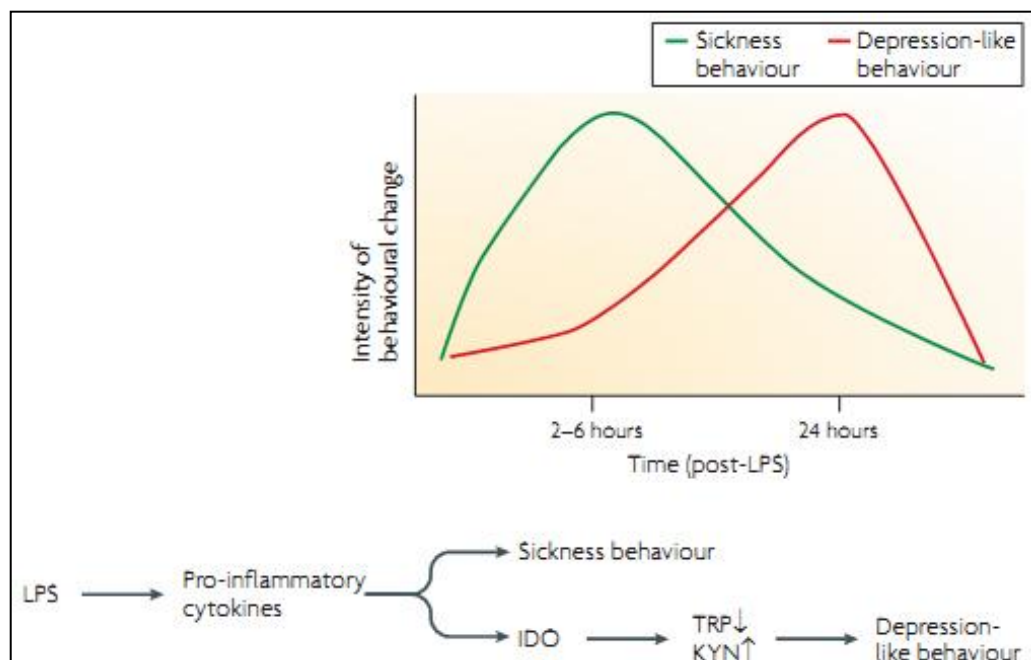
Também foi objetivo deste trabalho encontrar outra substância, não propriamente anti-inflamatória, que pudesse potencializar os efeitos antidepressivos induzidos pelo zinco. Foram avaliados os efeitos do paracetamol (acetaminofeno) em conjunto (e separado) com o zinco na eventual melhora do comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS. Foi escolhido o paracetamol, pois estudos recentes revelam que, assim como o zinco, pode atuar em sinergismo com antidepressivos, como a fluoxetina, potencializando a melhora do quadro depressivo (MANNA; UMATHE, 2014).

A respeito do uso do paracetamol no tratamento da depressão, além do estudo já citado, do efeito sinérgico com a fluoxetina (MANNA; UMATHE, 2014), não foi encontrado qualquer outro estudo fazendo essa ligação. Porém, devido ao potencial efeito anti-inflamatório (GRAHAM; SCOTT, 2005) que o paracetamol pode induzir após a ativação imune induzida pela administração de LPS e pelo efeito antidepressivo causado em camundongos após doses não efetivas de fluoxetina (MANNA; UMATHE, 2014), acredita-se que o tratamento com paracetamol, combinado ao zinco, tenha o potencial de ser capaz de reverter os danos causados pelo LPS e o comportamento tipo-depressivo.

Com base no conhecimento supracitado, que a depressão pode ser desencadeada por fatores imunes, e o fato da limitação dos medicamentos antidepressivos existentes, além de cada vez mais se investir na busca por antidepressivos ligados a substâncias que interferem no sistema neuroimune, o objetivo do estudo foi utilizar o zinco e/ou paracetamol como tratamento do comportamento doentio, dos níveis de ansiedade e do comportamento tipo-depressivo em ratos. Para induzir os efeitos tipo-depressivos em ratos usamos um modelo proposto na literatura por administrações repetidas de LPS (YIRMIYA, 1996; FRENOIS et al., 2007; DANTZER et al., 2008; BAY-RICHTER et al., 2011). Primeiramente foi necessário verificar a indução, progressão e eventual remissão do comportamento doentio induzido por LPS, com avaliações diárias da atividade geral em campo aberto e do peso corporal, segundo modelo descrito por Dantzer et al. (DANTZER et al., 2008), ilustrado na figura 1. Foram avaliados também os níveis de

ansiedade pelo teste claro-escuro, levando em consideração a possível comorbidade dos dois transtornos. O comportamento tipo-depressivo foi verificado pelo teste do nado forçado. Foram avaliados os níveis plasmáticos de biomarcadores ligados ao sistema neuroimune e a depressão: corticosterona e IFN-gama (ELISA), na busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos com as alterações. Por fim, foram realizadas avaliações cerebrais (córtex pré-frontal, núcleo accumbens e estriado, por técnica de imuno-histoquímica) para marcadores de neuroinflamação (proteína glial fibrilar ácida, GFAP) e sistema dopaminérgico (tirosina hidroxilase, TH), também na busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos com as alterações.

Figura 1 - Indução de comportamento tipo-depressivo pela administração de LPS em roedores, segundo Dantzer et al. (2008): Administração periférica de LPS induz comportamento doentio com ápice de 2 a 6 horas, verificado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, e consequente redução gradual. O comportamento tipo-depressivo atinge ápice 24 horas após o LPS, avaliado pelo aumento de imobilidade no teste do nado forçado ou no teste de suspensão na cauda, bem como pela diminuição de preferência de solução adocicada. O mecanismo de ação após liberação de citocinas pró-inflamatórias inclui aumento da atividade da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), que diminui os níveis de triptofano (TRP) e aumenta a produção de kinureninas (KYN) e outros metabólitos derivados do triptofano.



2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Utilizar o zinco e/ou paracetamol como tratamento do comportamento doentio, dos níveis de ansiedade e do comportamento tipo-depressivo em ratos.

2.2 *Objetivos específicos*

- Induzir experimentalmente o comportamento doentio em ratos com administrações de LPS.
- Induzir experimentalmente o comportamento tipo-depressivo em ratos com administrações de LPS.
- Estudar os efeitos do zinco e do paracetamol quanto ao comportamento doentio, por meio de avaliações diárias da atividade geral em campo aberto e peso corporal.
- Estudar os efeitos do zinco e do paracetamol quanto aos níveis de ansiedade, avaliado pelo teste claro-escuro.
- Estudar os efeitos do zinco e do paracetamol quanto ao comportamento tipo-depressivo, avaliado pelo teste do nado forçado.
- Estudar os efeitos do LPS, do zinco e do paracetamol quanto aos níveis plasmáticos de corticosterona por técnica de ELISA.
- Estudar os efeitos do LPS, do zinco e do paracetamol quanto aos níveis plasmáticos de IFN-gama por técnica de ELISA.
- Estudar os efeitos do LPS, do zinco e do paracetamol quanto à expressão de GFAP no córtex pré-frontal e núcleo accumbens por técnica de imuno-histoquímica.
- Estudar os efeitos do LPS, do zinco e do paracetamol quanto à expressão de TH no estriado por técnica de imuno-histoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 81 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar-Han machos adultos, com 98-137 dias de vida, fornecidos pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP). Esses ratos foram mantidos no Biotério da Universidade Paulista (São Paulo, SP) em gaiolas-moradia (45,5 x 34,5 x 20 cm, até 5 ratos por gaiola) com filtro na parte superior, em sistema de rack ventilado (Tecniplast, Buguggiate, VA, Itália), permitindo aeração e trocas de ar constante. Essas gaiolas-moradia foram forradas com maravalha (esterilizada e livre de resíduos). O ambiente possuía temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (entre 55% e 65%) controladas constantemente por sistema automatizado. O ciclo de luz também era automatizado, com luz artificial (12-horas claro/12-horas escuro, com as luzes ligadas às 7h00). Os animais tiveram livre acesso a ração irradiada (BioBase, Águas Frias, SC, Brasil) e água filtrada. Os animais foram utilizados nesse estudo de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da Universidade Paulista (CEUA-UNIP, protocolo nº 316/15). Essas diretrizes são baseadas nas normas do National Institutes of Health (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade. Todos os esforços possíveis foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Tratamentos, grupos e delineamento experimental

Ratos foram tratados por três dias consecutivos com zinco e/ou paracetamol, ou salina. Nos dois primeiros dias de tratamento, receberam também LPS ou salina 1 hora após o zinco e/ou paracetamol, ou salina. Uma hora após cada administração de LPS ou da segunda dose de salina, e 24 horas após a última administração de LPS ou salina correspondente, esses ratos foram avaliados quanto à indução e/ou progressão e/ou remissão do comportamento doentio, por meio de avaliações diárias da atividade geral em campo aberto e do peso corporal, totalizando três avaliações

(três dias) por animal. No terceiro dia de experimento, imediatamente após a avaliação em campo aberto, os ratos foram avaliados quanto aos seus níveis de ansiedade pelo teste claro-escuro. Imediatamente após o teste claro-escuro, os ratos foram avaliados quanto ao comportamento tipo-depressivo, verificados pelo teste do nado forçado. Imediatamente após a última avaliação comportamental, o plasma foi obtido para análises dos níveis de corticosterona e IFN-gama. Os encéfalos destes mesmos animais foram coletados para avaliações da expressão de GFAP e TH (córtex pré-frontal, núcleo accumbens e estriado). Um esquema do delineamento experimental está descrito na Figura 2. O protocolo detalhado de cada tratamento, avaliação comportamental e bioquímica está descrito nos subitens seguintes.

A relação das substâncias administradas aos ratos, o planejamento dos tratamentos e respectivos grupos experimentais são descritos a seguir. Os animais foram tratados com solução de zinco, de paracetamol, e/ou LPS, e/ou seus veículos.

O LPS foi obtido por extração fenólica a partir da bactéria *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA). A solução de LPS foi diluída em salina estéril a 0,9% e administrada via i.p., na dose de 1 mg/kg/dia, baseado nos estudos de Bay-Richter et al. (BAY-RICHTER et al., 2011) em ratos Wistar. Essa dose é considerada capaz de induzir comportamento doentio por menos de 24 horas, sem induzir sepse (BAY-RICHTER et al., 2011). Os ratos receberam LPS por dois dias consecutivos.

O zinco foi administrado na dose de 2 mg/kg/dia de sulfato de zinco ($ZnSO_4$, Sigma, St. Louis, MO, USA, cat. no. Z0635) em solução salina 0,9%, via subcutânea (s.c.) na nuca do animal, baseada nos estudos do grupo de Coyle (CHUA et al., 2012). Uma injeção s.c. de zinco promove um aumento imediato e consistente dos níveis de zinco plasmático, que chega a quatro ou cinco vezes o nível normal após 2 horas da injeção, retornando estes valores aos níveis normais a partir de 12 horas após a injeção (SUMMERS; ROFE; COYLE, 2006). O restabelecimento dos níveis de zinco nesse tratamento após cerca de 12 horas deve coincidir com o período de elevação nos níveis de citocinas após a exposição ao LPS (GAYLE et al., 2004; RENAUD et al., 2011); portanto, era esperado que o tratamento com zinco fosse capaz de manter os níveis de zinco próximos da normalidade enquanto as citocinas e o MT estivessem agindo. A solução de zinco foi sempre preparada no dia da

administração. Os animais receberam o zinco por três dias consecutivos, com intervalo de 24h entre cada injeção.

O paracetamol (Fagron, São Paulo, SP) foi administrado na dose de 100 mg/kg/dia, baseada nos estudos do grupo de Manna (2014). O paracetamol foi inicialmente diluído em álcool etílico absoluto. Após a homogeneização da solução, esta foi diluída em solução salina 0,9%, em uma proporção de 5% de etanol para 95% de salina. A solução foi administrada via i.p. Esta dose é considerada eficaz, potencializando os efeitos antidepressivos, quando combinado a fluoxetina, por exemplo (MANNA; UMATHE, 2014). Os animais receberam o paracetamol por três dias consecutivos, com intervalo de 24h entre cada injeção.

A solução salina estéril a 0,9% foi aplicada também para os ratos como veículo (grupo controle). A salina foi administrada em volume similar, 0,1 mL/100 g também por via i.p. Além do grupo controle salina, foi avaliado outro grupo com o veículo etanol absoluto 5% diluído em salina, no caso, o veículo dos grupos onde o paracetamol foi utilizado.

O tratamento com zinco e/ou com paracetamol ocorreu sempre 1 hora antes à exposição ao LPS. Foram avaliados nove grupos (n = 8-10 ratos por grupo, exceto para o grupo etanol, com n = 5), definidos na Tabela 1.

Figura 2 - Delineamento dos experimentos realizados: indução do comportamento doentio e comportamento tipo-depressivo pela administração de LPS e tratamento com zinco e/ou paracetamol. Foram avaliados também os níveis de ansiedade, de corticosterona, de interferon (IFN)-gama, de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e de tirosina hidroxilase (TH).

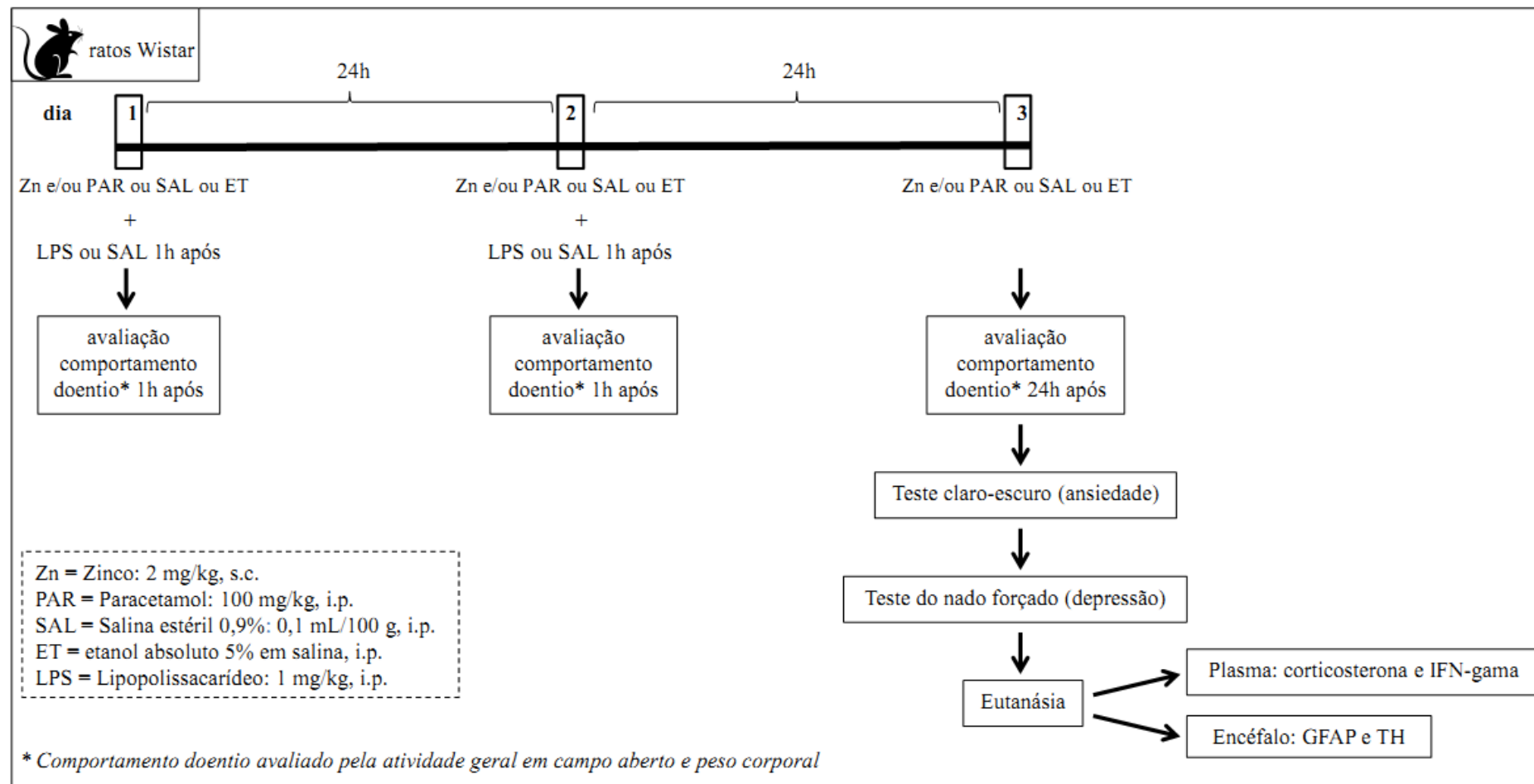


Tabela 1 – Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos (soluções administradas), divididos por dias e períodos (intervalos de administração). Ratos foram tratados por três dias consecutivos com zinco e/ou paracetamol, ou salina. Nos dois primeiros dias de tratamento, receberam também LPS ou salina 1 hora após o zinco e/ou paracetamol, ou salina. Foram avaliados nove grupos (n = 8-10 ratos por grupo, exceto para o grupo etanol, com n = 5).

Grupo	dia 1		dia 2		dia 3
	0h	1h	0h	1h	
SAL+SAL (grupo controle)	salina	salina	salina	salina	salina
SAL+LPS	salina	LPS	salina	LPS	salina
Zn+SAL	zinco	salina	zinco	salina	zinco
Zn+LPS	zinco	LPS	zinco	LPS	zinco
PAR+SAL	paracetamol	salina	paracetamol	salina	paracetamol
PAR+LPS	paracetamol	LPS	paracetamol	LPS	paracetamol
Zn+PAR+SAL	zinco e paracetamol	salina	zinco e paracetamol	salina	zinco e paracetamol
Zn+PAR+LPS	zinco e paracetamol	LPS	zinco e paracetamol	LPS	zinco e paracetamol
ET+SAL	etanol 5%	salina	etanol 5%	salina	etanol 5%

3.3 Avaliação do comportamento doentio pela atividade geral em campo aberto e peso corporal

No aspecto experimental, a avaliação da atividade geral em campo aberto e do peso corporal dos indivíduos doentes são testes muito utilizados para a avaliação do comportamento doentio em roedores (YIRMIYA, 1996; SWIERGIEL; DUNN, 2007). A atividade geral em campo aberto e o peso corporal (g) foram avaliados uma hora após cada administração de LPS ou salina correspondente e 24 horas após a última administração de LPS ou salina correspondente. Portanto, cada animal foi avaliado quando à atividade geral em campo aberto por três vezes, nos dias 1, 2 e 3 de experimento (Figura 2). Para a análise do peso corporal, além dessas três avaliações (2h, 24 e 48h), os ratos foram previamente pesados antes dos tratamentos, sendo considerados como avaliação à 0h. Essa pesagem foi importante para calcular a diferença de peso progressiva dos animais ao longo dos dias, isto é, calculando o valor dos pesos em cada dia subtraído do valor do tempo 0h, de modo a desconsiderar variações prévias de peso antes dos tratamentos.

A atividade geral em campo aberto avalia principalmente parâmetros motores e exploratórios (PATTI et al., 2005). A arena de campo aberto consistiu em uma arena redonda (96 cm de diâmetro em madeira, 29 cm altura da parede em metal, tinta acrílica impermeável, cinza claro), subdividida em 25 partes. Os animais foram individual e gentilmente colocados no centro da arena e foram avaliados em sessões de 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram: frequência de locomoção (número de unidades do chão adentradas com todas as patas), frequência de levantar (número de vezes que o animal apresenta postura de permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, podendo ou não tocar com as patas anteriores as paredes do campo aberto), e tempo em segundos de imobilidade. A sala teste contendo a arena possuía iluminação fraca e era isolada do experimentador durante a realização do teste. Uma filmadora colocada acima da arena foi utilizada e os vídeos foram analisados posteriormente. O aparato foi limpo com solução etanol/água 5% antes de colocar cada animal na arena, para eliminar possíveis traços de odor deixados pelos outros animais que poderiam interferir no comportamento.

3.4 Avaliação dos níveis de ansiedade pelo teste claro-escuro

Após a última avaliação no teste do campo aberto (no dia 3 de experimento), os animais foram conduzidos para o teste claro-escuro. Esse modelo é baseado na aversão inata de roedores a locais claros/iluminados, gerando o conflito entre o impulso por explorar o ambiente novo, e em evitar o compartimento iluminado (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; CAMPOS et al., 2013). O aparato consistiu em uma caixa de acrílico (80 cm de comprimento, 40 cm de largura, 30 cm de altura) contendo dois compartimentos (separados por uma porta de 13 cm de largura por 8 cm de altura): um compartimento escuro, com paredes e piso pretos (34 cm de comprimento); outro compartimento claro, com paredes e piso brancos (44 cm de comprimento) e diretamente iluminado com lâmpada fluorescente branca (15W, 4100K). Cada rato foi inserido no centro do compartimento claro, orientando sua cabeça para a parede oposta da porta do compartimento, podendo explorar livremente o aparato em sessão de 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram: latência (em segundos) para entrar no lado escuro; tempo total de permanência (em segundos) no lado escuro; tempo total de permanência (em segundos) no lado claro; frequência de levantar no lado escuro; frequência de levantar no lado claro; e frequência de levantar total (somatória dos lados escuro e claro). A sala teste, que era uma sala pequena e com luz de baixa intensidade, era isolada do experimentador. Essa sala continha uma filmadora disposta acima da arena, que foi utilizada para coletar os vídeos que foram analisados posteriormente. O aparato foi limpo com solução álcool/água 5% antes de colocar cada animal na arena, para eliminar possíveis traços de odor deixados pelos outros animais que poderiam interferir no comportamento.

3.5 Avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo teste do nado forçado

No último dia dos experimentos, imediatamente após o teste do claro-escuro, os animais foram avaliados quanto ao comportamento tipo-depressivo e eventual efeito antidepressivo no teste do nado forçado (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; O'CONNOR et al., 2009; BAY-RICHTER et al., 2011). Esse teste é a ferramenta mais utilizada para avaliar atividade antidepressiva pré-clínica. Ele se baseia no fato

da água ser aversiva para os ratos, gerando comportamento de tentativa de escapada. Porém, após movimentos de natação e escalada, os ratos tendem a desenvolver postura imóvel. Essa postura imóvel representa falha no comportamento de persistência de escalada, sendo que quanto mais o animal ficar imóvel, não tentando escapar, representa maior comportamento tipo-depressivo (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

O aparato consiste em um cilindro acrílico transparente (46 cm de altura, 20 cm de diâmetro) contendo 30 cm de água a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Cada animal foi individual e gentilmente inserido no aparato, e lá mantido por 7 minutos. Foi avaliada a latência (em segundos) para a primeira imobilidade. Além disso, o tempo total de imobilidade (em segundos) foi avaliado ao longo de toda a sessão de 7 minutos filmada. Imobilidade foi considerada pela ausência de comportamentos ativos, isto é, quando o animal não esteve nadando ou escalando, e permaneceu passivamente flutuando, ou realizando apenas movimentos mínimos necessários para manter as narinas acima da água. Por fim, foi avaliado o tempo total de escalada (em segundos) ao longo de toda a sessão. A sala teste, que era uma sala pequena e com luz de baixa intensidade, era isolada do experimentador. Essa sala continha uma filmadora disposta em frente da arena, que foi utilizada para coletar os vídeos, os quais foram analisados posteriormente. A água do cilindro era trocada entre a avaliação de cada animal, realizando a limpeza das paredes e remoção de qualquer dejetos deixado pelo animal anterior, para eliminar possíveis traços de odor que poderiam interferir no comportamento. As imagens da câmera eram transmitidas ao vivo para a sala do lado, onde os experimentadores monitoravam se algum rato iniciasse afogamento, para propiciar pronto resgate. Entretanto, nenhum animal se afogou ou precisou ser removido das análises.

3.6 Corticosterona e *IFN-gama*

Imediatamente após a avaliação no nado forçado, os ratos foram decapitados, e o sangue do tronco foi coletado em tubos cônicos que continham 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram centrifugadas (3.500 RPMs, 15 min) e o plasma foi obtido. Amostras de plasma de cada animal foram aliquotadas e estocadas em diferentes tubos cônicos para análises separadas dos níveis de

corticosterona e IFN-gama, usando kits comerciais de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) em duplicata, de acordo com as instruções contidas nos manuais dos fabricantes. Os níveis de corticosterona foram determinados com o kit Arbor Assays (cat. no. K014-H, Ann Arbor, USA). Os níveis de IFN-gama foram determinados com o kit da R&D Systems (Rat IFN-gamma Quantikine ELISA kit, R&D Systems, SRIF00). Os resultados estão expressos em ng/mL.

3.7 GFAP e TH

Os encéfalos dos mesmos ratos onde o sangue foi coletado, também foram coletados e imediatamente e fixados em solução de formol a 10% em tampão fosfato por pelo menos 48 horas para desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes transversais de 5 µm foram obtidos, montados em lâminas histológicas e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E), sendo observados e fotografados em fotomicroscópio Nikon E200. Cortes histológicos de blocos selecionados foram colhidos em lâminas tratadas com silano (Sigma) a 4% em acetona, objetivando uma melhor aderência dos mesmos. Tais cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol absoluto, etanol a 95%, a 80%, a 70% e a 50% e, a seguir, fervidos durante 15 minutos em forno de micro-ondas convencional (potência máxima), imersos em tampão citrato 0,01 M (ácido cítrico 0,01 M e citrato de sódio 0,01 M, 1:3, pH 6,0). Depois de resfriados durante 20 minutos, a peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se as lâminas por 30 minutos em metanol contendo 10% de peróxido de hidrogênio 30 volumes.

Para a marcação imuno-histoquímica da GFAP e TH, o método utilizado foi o da avidina-biotina, sendo cada procedimento intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato. Os cortes foram incubados durante 16 horas a 4°C em câmara úmida, com o anticorpo monoclonal primário anti-GFAP (*Rabbit anti-cow GFA*, code number ZO334, Dako) e anticorpo monoclonal anti-TH (*prediluted mouse anti-tyrosine hydroxylase*, catalog number IHCR1005-6, Chemicon IHC Select Research), ambos padronizados na diluição 1:1000, a qual, por prévia titulação, foi considerada a mais adequada. Para tal diluição foi utilizada solução contendo soro-albumina bovina a 5% em água destilada (1,25 mL), azida sódica a

5% em água destilada (2,5 mL) e solução salina tamponada (59 ml). Posteriormente, foi realizada a incubação dos cortes por 30 minutos com o anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de coelho (Universal LSABTM 2 Kit / HRP, Rb / Mo, K0609-1, Dako) na diluição 1:400 e, após, a aplicação por 30 minutos do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase, diluído em solução salina tamponada com fosfato (Universal LSABTM 2 Kit / HRP, Rb / Mo, Dako). A imunorreatividade foi visualizada pela aplicação sobre os cortes de diaminobenzidina (DAB, Sigma) a 0,1% como cromógeno e peróxido de hidrogênio a 0,5%. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética sob lamínula. Todas as reações foram acompanhadas por lâminas controle negativo, submetidas a todas as etapas do procedimento, porém suprimindo-se a aplicação do anticorpo primário.

As áreas encefálicas escolhidas para este estudo foram o córtex pré-frontal, o estriado e o núcleo accumbens, por suas relações com a depressão e com a neuroinflamação (DANTZER et al., 2008; BAY-RICHTER et al., 2011). Foi analisada a resposta astrocitária mediante estudo da expressão de GFAP. Além disso, foi avaliada a expressão de TH, a primeira enzima na via de biossíntese de dopamina (BAKER et al., 2003).

Dez fotomicrografias do córtex pré-frontal e do estriado (caudado e putâmen) e quatro fotomicrografias do núcleo accumbens foram feitas usando objetiva de 40x do microscópio Nikon E200. A área de astrócitos e de seus processos e de neurônios positivos para TH, marcados em marrom, foram automaticamente calculadas, em pixels, respectivamente por meio dos *softwares* Image pro plus 6® e Methamorph®, calibrado com os filtros de cores digitais regulando os bits vermelho, verde e azul. Apenas as células positivas foram incluídas e o fundo foi excluído da medida. Os resultados obtidos para os distintos grupos foram analisados estatisticamente para possíveis diferenças.

3.8 Análise estatística (forma de análise dos resultados)

Foi verificado a homocedasticidade e normalidade dos dados (teste de Bartlett). Para os dados paramétricos com análises de oito ou nove grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de

comparações múltiplas de Newman-Keuls. Nos casos de avaliações em dias consecutivos, a ANOVA de duas vias foi utilizada, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (EP).

4 RESULTADOS

O LPS induziu o comportamento doentio e o comportamento tipo-depressivo, assim como elevou os níveis de IFN-gama e a expressão de GFAP nos ratos. O zinco preveniu tanto os prejuízos comportamentais quanto os bioquímicos. Embora o tratamento com paracetamol e a associação zinco+paracetamol tenham revelado aparente efeito benéfico na melhora de alguns parâmetros, não se pode afirmar este ser um efeito robusto. A ansiedade, corticosterona e TH parecem não estarem relacionadas às demais alterações comportamentais e neuroimunes.

Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thik@outlook.com

5 DISCUSSÃO

Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente as conclusões do trabalho, sem sua discussão. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thik@outlook.com

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo, a administração de LPS induziu o comportamento doentio e o comportamento tipo-depressivo, assim como elevou os níveis de IFN-gama e a expressão de GFAP (inflamação periférica e central) nos ratos. O zinco preveniu tanto o comportamento doentio quanto o comportamento tipo-depressivo, e a elevação de IFN-gama e de GFAP. Embora o tratamento com paracetamol e a associação zinco+paracetamol tenham revelado aparente efeito benéfico na melhora de alguns parâmetros comportamentais e bioquímicos, não se pode afirmar este ser um efeito robusto.

Os níveis de ansiedade e de corticosterona não foram afetados por nenhum dos tratamentos (LPS, zinco e paracetamol). A expressão de TH também não pareceu estar relacionada às alterações comportamentais e neuroimunes.

Assim, pode-se destacar o efeito benéfico do sulfato de zinco no tratamento do comportamento doentio e tipo-depressivo, sem o auxílio de antidepressivos. Nossos resultados sugerem o uso do zinco em estudos clínicos, no caso, como tratamento de pacientes deprimidos.

Além disso, os achados relativos ao IFN-gama e GFAP revelaram sua relação com a gênese do comportamento doentio e da depressão e que os tratamentos que tenham a capacidade de interferir com os níveis de IFN-gama e a expressão de GFAP podem auxiliar na melhora dos sintomas desses transtornos.

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

AKHONDZADEH, S.; JAFARI, S.; RAISI, F.; NASEHI, A. A.; GHOREISHI, A.; SALEHI, B.; MOHEBBI-RASA, S.; RAZNAHAN, M.; KAMALIPOUR, A. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depress Anxiety*, v. 26, n. 7, p. 607-611, 2009.

ALLEN, A. J.; LEONARD, H.; SWEDO, S. E. Current knowledge of medications for the treatment of childhood anxiety disorders. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, v. 34, n. 8, p. 976-986, 1995.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. [Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems]. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.

BAKER, H.; KOBAYASHI, K.; OKANO, H.; SAINO-SAITO, S. Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 23, n. 4-5, p. 507-518, 2003.

BARBOSA, F. M.; CABRAL, D.; KABADAYAN, F.; BONDAN, E. F.; DE FATIMA MONTEIRO MARTINS, M.; KIRSTEN, T. B.; BONAMIN, L. V.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; MARTHA BERNARDI, M.; SARACENI, C. H. C. Depressive behavior induced by unpredictable chronic mild stress increases dentin hypersensitivity in rats. *Archives of Oral Biology*, v. 80, n., p. 164-174, 2017.

BAY-RICHTER, C.; JANELIDZE, S.; HALLBERG, L.; BRUNDIN, L. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. *Behavioural Brain Research*, v. 222, n. 1, p. 193-199, 2011.

BEYER, C. E.; DWYER, J. M.; PIESLA, M. J.; PLATT, B. J.; SHEN, R.; RAHMAN, Z.; CHAN, K.; MANNERS, M. T.; SAMAD, T. A.; KENNEDY, J. D.; BINGHAM, B.; WHITESIDE, G. T. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiology of Disease*, v. 39, n. 2, p. 148-155, 2010.

BOURRE, J. M. Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 1: micronutrients. *J Nutr Health Aging*, v. 10, n. 5, p. 377-385, 2006.

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 35 Suppl 2, n., p. S101-111, 2013.

CARROLL, L. J.; CASSIDY, J. D.; COTE, P. Factors associated with the onset of an episode of depressive symptoms in the general population. *J Clin Epidemiol*, v. 56, n. 7, p. 651-658, 2003.

CHAFFEE, B. W.; KING, J. C. Effect of zinc supplementation on pregnancy and infant outcomes: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol*, v. 26 Suppl 1, n., p. 118-137, 2012.

CHECKLEY, S. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *British Medical Bulletin*, v. 52, n. 3, p. 597-617, 1996.

CHUA, J. S.; COWLEY, C. J.; MANAVIS, J.; ROFE, A. M.; COYLE, P. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in neurodevelopmental damage that is ameliorated by zinc in mice. *Brain Behavior and Immunity*, v. 26, n. 2, p. 326-336, 2012.

CIESLIK, K.; KLENK-MAJEWSKA, B.; DANILCZUK, Z.; WROBEL, A.; LUPINA, T.; OSSOWSKA, G. Influence of zinc supplementation on imipramine effect in a chronic unpredictable stress (CUS) model in rats. *Pharmacol Rep*, v. 59, n. 1, p. 46-52, 2007.

CLARK, D. C. Suicide risk assessment and prediction in the 1990s. *Crisis*, v. 11, n. 2, p. 104-112, 1990.

COLMAN, I.; ATAULLAHJAN, A. Life course perspectives on the epidemiology of depression. *Can J Psychiatry*, v. 55, n. 10, p. 622-632, 2010.

COYLE, P.; TRAN, N.; FUNG, J. N.; SUMMERS, B. L.; ROFE, A. M. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. *Behavioural Brain Research*, v. 197, n. 1, p. 210-218, 2009.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CUNHA, M. P.; MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E.; CAPRA, J. C.; RODRIGUES, A. L. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, n. 8, p. 1913-1920, 2008.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behavior and Immunity*, v. 21, n. 2, p. 153-160, 2007.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 46-56, 2008.

DE KLOET, A. D.; PIOQUINTO, D. J.; NGUYEN, D.; WANG, L.; SMITH, J. A.; HILLER, H.; SUMNERS, C. Obesity induces neuroinflammation mediated by altered

expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. *Physiology & Behavior*, v. 136, n., p. 31-38, 2014.

DIGIROLAMO, A. M.; RAMIREZ-ZEA, M.; WANG, M.; FLORES-AYALA, R.; MARTORELL, R.; NEUFELD, L. M.; RAMAKRISHNAN, U.; SELLEN, D.; BLACK, M. M.; STEIN, A. D. Randomized trial of the effect of zinc supplementation on the mental health of school-age children in Guatemala. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 92, n. 5, p. 1241-1250, 2010.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E. K.; LANCTOT, K. L. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*, v. 67, n. 5, p. 446-457, 2010.

EISENBERGER, N. I.; INAGAKI, T. K.; MASHAL, N. M.; IRWIN, M. R. Inflammation and social experience: an inflammatory challenge induces feelings of social disconnection in addition to depressed mood. *Brain Behavior and Immunity*, v. 24, n. 4, p. 558-563, 2010.

FREEMAN, M. P.; FREEMAN, S. A.; MCELROY, S. L. The comorbidity of bipolar and anxiety disorders: prevalence, psychobiology, and treatment issues. *Journal of Affective Disorders*, v. 68, n. 1, p. 1-23, 2002.

FRENOIS, F.; MOREAU, M.; O'CONNOR, J.; LAWSON, M.; MICON, C.; LESTAGE, J.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R.; CASTANON, N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32, n. 5, p. 516-531, 2007.

FURUKAWA, Y.; KISH, S. Tyrosine Hydroxylase Deficiency. v., n., p., 1993.

GAYLE, D. A.; BELOOSESKY, R.; DESAI, M.; AMIDI, F.; NUNEZ, S. E.; ROSS, M. G. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing

hormone in the fetal rat brain. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 286, n. 6, p. R1024-1029, 2004.

GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Mechanism of action of paracetamol. *Am J Ther*, v. 12, n. 1, p. 46-55, 2005.

HAJOS, F.; KALMAN, M. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. II. Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. *Experimental Brain Research*, v. 78, n. 1, p. 164-173, 1989.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HAVA, G.; VERED, L.; YAEL, M.; MORDECHAI, H.; MAHOUD, H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Developmental Psychobiology*, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; RICE, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 5, p. 1932-1936, 1990.

HILL, M. N.; CARRIER, E. J.; MCLAUGHLIN, R. J.; MORRISH, A. C.; MEIER, S. E.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *Journal of Neurochemistry*, v. 106, n. 6, p. 2322-2336, 2008.

HOGESTATT, E. D.; JONSSON, B. A.; ERMUND, A.; ANDERSSON, D. A.; BJORK, H.; ALEXANDER, J. P.; CRAVATT, B. F.; BASBAUM, A. I.; ZYGMUNT, P. M. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 36, p. 31405-31412, 2005.

HUANG, C. F.; DU, J. X.; DENG, W.; CHENG, X. C.; ZHANG, S. Y.; ZHAO, S. J.; TAO, M. J.; CHEN, G. Z.; HAO, X. Q. Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre- and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. *Neuroscience*, v. 286, n., p. 364-370, 2015.

HUMPHRIES, L.; VIVIAN, B.; STUART, M.; MCCLAIN, C. J. Zinc deficiency and eating disorders. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 50, n. 12, p. 456-459, 1989.

JENKINS, E.; GOLDNER, E. M. Approaches to understanding and addressing treatment-resistant depression: a scoping review. *Depress Res Treat*, v. 2012, n., p. 469680, 2012.

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

KATZ, R. L.; KEEN, C. L.; LITT, I. F.; HURLEY, L. S.; KELLAMS-HARRISON, K. M.; GLADER, L. J. Zinc deficiency in anorexia nervosa. *J Adolesc Health Care*, v. 8, n. 5, p. 400-406, 1987.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KIRCANSKI, K.; LEMOULT, J.; ORDAZ, S.; GOTLIB, I. H. Investigating the nature of co-occurring depression and anxiety: Comparing diagnostic and dimensional research approaches. *Journal of Affective Disorders*, v., n., p., 2016.

KIRSTEN, T. B.; LIPPI, L. L.; BEVILACQUA, E.; BERNARDI, M. M. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1 β levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS One*, v. 8, n. 12, p. e82244, 2013.

KOVACS, M.; DEVLIN, B. Internalizing disorders in childhood. *J Child Psychol Psychiatry*, v. 39, n. 1, p. 47-63, 1998.

LARSON, S. J.; DUNN, A. J. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behavior and Immunity*, v. 15, n. 4, p. 371-387, 2001.

LIU, W.; GE, T.; LENG, Y.; PAN, Z.; FAN, J.; YANG, W.; CUI, R. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plasticity*, v. 2017, n., p. 6871089, 2017.

LOFTIS, J. M.; HAUSER, P. The phenomenology and treatment of interferon-induced depression. *Journal of Affective Disorders*, v. 82, n. 2, p. 175-190, 2004.

LONNQVIST, J. K.; HENRIKSSON, M. M.; ISOMETSA, E. T.; MARTTUNEN, M. J.; HEIKKINEN, M. E.; ARO, H. M.; KUOPPASALMI, K. I. Mental disorders and suicide prevention. *Psychiatry Clin Neurosci*, v. 49 Suppl 1, n., p. S111-116, 1995.

MAES, M.; D'HAESE, P. C.; SCHARPE, S.; D'HONDT, P.; COSYNS, P.; DE BROE, M. E. Hypozincemia in depression. *Journal of Affective Disorders*, v. 31, n. 2, p. 135-140, 1994.

MAES, M.; VANDOOOLAEGHE, E.; NEELS, H.; DEMEDTS, P.; WAUTERS, A.; MELTZER, H. Y.; ALTAMURA, C.; DESNYDER, R. Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness. *Biological Psychiatry*, v. 42, n. 5, p. 349-358, 1997.

MANNA, S. S.; UMATHE, S. N. Paracetamol potentiates the antidepressant-like and anticomulsive-like effects of fluoxetine. *Behavioural Pharmacology*, v., n., p., 2014.

MARET, W.; SANDSTEAD, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 20, n. 1, p. 3-18, 2006.

MAYERHOFER, R.; FROHLICH, E. E.; REICHMANN, F.; FARZI, A.; KOGELNIK, N.; FROHLICH, E.; SATTLER, W.; HOLZER, P. Diverse action of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide on neuroinflammation, blood-brain barrier disruption, and anxiety in mice. *Brain Behavior and Immunity*, v., n., p., 2016.

MAYWALD, M.; RINK, L. Zinc homeostasis and immunosenescence. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [in press], v., n., p., 2014.

MCLOUGHLIN, I. J.; HODGE, J. S. Zinc in depressive disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 82, n. 6, p. 451-453, 1990.

MCNAB, F.; MAYER-BARBER, K.; SHER, A.; WACK, A.; O'GARRA, A. Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 2, p. 87-103, 2015.

MESQUITA JUNIOR, D.; ARAUJO, J. A.; CATELAN, T. T.; SOUZA, A. W.; CRUVINEL WDE, M.; ANDRADE, L. E.; SILVA, N. P. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol*, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MEYER, U.; FELDON, J.; FATEMI, S. H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 33, n. 7, p. 1061-1079, 2009.

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

MULLER, N.; SCHWARZ, M. J.; DEHNING, S.; DOUHE, A.; CEROVECKI, A.; GOLDSTEIN-MULLER, B.; SPELLMANN, I.; HETZEL, G.; MAINO, K.; KLEINDIENST, N.; MOLLER, H. J.; AROLT, V.; RIEDEL, M. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-

blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Molecular Psychiatry*, v. 11, n. 7, p. 680-684, 2006.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, v. 349, n. 9063, p. 1436-1442, 1997.

MYINT, A. M.; SCHWARZ, M. J.; STEINBUSCH, H. W.; LEONARD, B. E. Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment. *Metabolic Brain Disease*, v. 24, n. 1, p. 55-68, 2009.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Molecular Psychiatry*, v. 1, n. 4, p. 336-342, 1996.

NOWAK, G.; SIWEK, M.; DUDEK, D.; ZIEBA, A.; PILC, A. Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. *Polish Journal of Pharmacology*, v. 55, n. 6, p. 1143-1147, 2003.

NOWAK, G.; SZEWCZYK, B.; PILC, A. Zinc and depression. An update. *Pharmacol Rep*, v. 57, n. 6, p. 713-718, 2005.

O'CONNOR, J. C.; LAWSON, M. A.; ANDRE, C.; MOREAU, M.; LESTAGE, J.; CASTANON, N.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. 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.

PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry*, v. 49, n. 5, p. 391-404, 2001.

PARKER, G.; BROTHIE, H. Gender differences in depression. *International Review of Psychiatry*, v. 22, n. 5, p. 429-436, 2010.

PARTYKA, A.; JASTRZEBSKA-WIESEK, M.; SZEWCZYK, B.; STACHOWICZ, K.; SLAWINSKA, A.; POLESZAK, E.; DOBOSZEWSKA, U.; PILC, A.; NOWAK, G. Anxiolytic-like activity of zinc in rodent tests. *Pharmacol Rep*, v. 63, n. 4, p. 1050-1055, 2011.

PATTI, C. L.; FRUSSA-FILHO, R.; SILVA, R. H.; CARVALHO, R. C.; KAMEDA, S. R.; TAKATSU-COLEMAN, A. L.; CUNHA, J. L.; ABILIO, V. C. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 81, n. 4, p. 923-927, 2005.

PERSOONS, P.; VERMEIRE, S.; DEMYTTENAERE, K.; FISCHLER, B.; VANDENBERGHE, J.; VAN OUDENHOVE, L.; PIERIK, M.; HLAVATY, T.; VAN ASSCHE, G.; NOMAN, M.; RUTGEERTS, P. The impact of major depressive disorder on the short- and long-term outcome of Crohn's disease treatment with infliximab. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 22, n. 2, p. 101-110, 2005.

RAEDLER, T. J. Inflammatory mechanisms in major depressive disorder. *Curr Opin Psychiatry*, v. 24, n. 6, p. 519-525, 2011.

RENAUD, S. J.; COTECHINI, T.; QUIRT, J. S.; MACDONALD-GOODFELLOW, S. K.; OTHMAN, M.; GRAHAM, C. H. Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient uteroplacental perfusion. *Journal of Immunology*, v. 186, n. 3, p. 1799-1808, 2011.

SHEEN, C. L.; DILLON, J. F.; BATEMAN, D. N.; SIMPSON, K. J.; MACDONALD, T. M. Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system. *QJM*, v. 95, n. 9, p. 609-619, 2002.

SHIFFMAN, M. L. Pegylated interferons: what role will they play in the treatment of chronic hepatitis C? *Curr Gastroenterol Rep*, v. 3, n. 1, p. 30-37, 2001.

SINGH, B. K.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A. K.; DWIVEDI, A.; SINGH, S.; KUMAR, A.; SINGH, D.; PATEL, D. K.; RAY, R. S.; JAIN, S. K.; SINGH, C. Neuronal Nitric Oxide Synthase Negatively Regulates Zinc-Induced Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 54, n. 4, p. 2685-2696, 2017.

SINGLA, N.; DHAWAN, D. K. Zinc Improves Cognitive and Neuronal Dysfunction During Aluminium-Induced Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 54, n. 1, p. 406-422, 2017.

SIWEK, M.; DUDEK, D.; PAUL, I. A.; SOWA-KUCMA, M.; ZIEBA, A.; POPIK, P.; PILC, A.; NOWAK, G. Zinc supplementation augments efficacy of imipramine in treatment resistant patients: a double blind, placebo-controlled study. *Journal of Affective Disorders*, v. 118, n. 1-3, p. 187-195, 2009.

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

SPASOJEVIC, N.; JOVANOVIC, P.; DRONJAK, S. Differential regulation of catecholamine synthesis and transport in rat adrenal medulla by fluoxetine treatment. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 87, n. 1, p. 343-350, 2015.

SUMMERS, B. L.; ROFE, A. M.; COYLE, P. Prenatal zinc treatment at the time of acute ethanol exposure limits spatial memory impairments in mouse offspring. *Pediatric Research*, v. 59, n. 1, p. 66-71, 2006.

SWEDO, S. E.; LEONARD, H. L.; ALLEN, A. J. New developments in childhood affective and anxiety disorders. *Curr Probl Pediatr*, v. 24, n. 1, p. 12-38, 1994.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 86, n. 4, p. 651-659, 2007.

SZEWCZYK, B.; BRANSKI, P.; WIERONSKA, J. M.; PALUCHA, A.; PILC, A.; NOWAK, G. Interaction of zinc with antidepressants in the forced swimming test in mice. *Polish Journal of Pharmacology*, v. 54, n. 6, p. 681-685, 2002.

SZEWCZYK, B.; POLESZAK, E.; WLAZ, P.; WROBEL, A.; BLICHARSKA, E.; CICHY, A.; DYBALA, M.; SIWEK, A.; POMIERNY-CHAMIOLO, L.; PIOTROWSKA, A.; BRANSKI, P.; PILC, A.; NOWAK, G. The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 33, n. 2, p. 323-329, 2009.

TAKEDA, A.; TAMANO, H.; KAN, F.; ITOH, H.; OKU, N. Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation. *Behavioural Brain Research*, v. 177, n. 1, p. 1-6, 2007.

TEKIN, I.; ROSKOSKI, R., JR.; CARKACI-SALLI, N.; VRANA, K. E. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neural Transm (Vienna)*, v. 121, n. 12, p. 1451-1481, 2014.

THOMPSON, C.; OSTLER, K.; PEVELER, R. C.; BAKER, N.; KINMONTH, A. L. Dimensional perspective on the recognition of depressive symptoms in primary care: The Hampshire Depression Project 3. *British Journal of Psychiatry*, v. 179, n., p. 317-323, 2001.

TUERK, M. J.; FAZEL, N. Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol*, v. 25, n. 2, p. 136-143, 2009.

TYRING, S.; GOTTLIEB, A.; PAPP, K.; GORDON, K.; LEONARDI, C.; WANG, A.; LALLA, D.; WOOLLEY, M.; JAHREIS, A.; ZITNIK, R.; CELLA, D.; KRISHNAN, R. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet*, v. 367, n. 9504, p. 29-35, 2006.

WICHERS, M. C.; KENIS, G.; LEUE, C.; KOEK, G.; ROBBAEYS, G.; MAES, M. Baseline immune activation as a risk factor for the onset of depression during interferon-alpha treatment. *Biological Psychiatry*, v. 60, n. 1, p. 77-79, 2006.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*, v. 6, n., p. 78-93, 2017.

XIE, Y.; WANG, Y.; ZHANG, T.; REN, G.; YANG, Z. Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. *Journal of Biomedical Science*, v. 19, n., p. 14, 2012.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Research*, v. 711, n. 1-2, p. 163-174, 1996.

ZIMOMRA, Z. R.; PORTERFIELD, V. M.; CAMP, R. M.; JOHNSON, J. D. Time-dependent mediators of HPA axis activation following live *Escherichia coli*. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 301, n. 6, p. R1648-1657, 2011.

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 316/15 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado ""Efeitos do zinco e do paracetamol no comportamento doentio e no comportamento tipo-depressivo de ratos induzido por lipopolissacarídeo" faz parte do projeto "Efeitos do zinco e do paracetamol no comportamento tipo-depressivo de ratos induzido por lipopolissacarídeo", "Espécie utilizada: - " Rato "Número de animais utilizados: 81 machos- " sob a responsabilidade de " THIAGO BERTI KIRSTEN, RENAN MONTEIRO e DANILO CABRAL ", está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 15 dias do mês de abril de 2015.



Juliana Guizi
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP