



LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MOLECULAR  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

JOSÉ ROGÉRIO SOUZA MONTEIRO

**Novas ferramentas terapêuticas contra a convulsão e o comportamento tipo  
depressivo: ensaios pré-clínicos com açaí clarificado**

**BELÉM**

**2016**

JOSÉ ROGÉRIO SOUZA MONTEIRO

**Novas ferramentas terapêuticas contra a convulsão e o comportamento tipo  
depressivo: ensaios pré-clínicos com açaí clarificado**

Defesa de doutorado submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da  
Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elena Crespo López

**BELÉM**  
**2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Monteiro, José Rogério Souza, 1985-

Novas ferramentas terapêuticas contra a convulsão e o comportamento tipo depressivo: ensaios pré-clínicos com açaí clarificado / José Rogério Souza Monteiro. - 2016.

Orientadora: Maria Elena Crespo López.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Açaí. 2. Convulsões - tratamento. 3. Depressão - tratamento. I. Título.

CDD 22. ed. 634.6

---

JOSÉ ROGÉRIO SOUZA MONTEIRO

**Novas ferramentas terapêuticas contra a convulsão e o comportamento tipo  
depressivo: ensaios pré-clínicos açai clarificado**

Defesa de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elena Crespo López.

Data: 02 de Setembro de 2016

Banca:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Barbarella de Matos Macchi - UFPA

---

Prof. Dr. Moisés Hamoy - UFPA

---

Dr. Osmar Alves Lameira - EMBRAPA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Soberano DEUS que sempre esteve do meu lado, nos momentos de alegria e de dificuldade, dando-me sustento para continuar este trabalho. Se hoje estou escrevendo isso é porque o Senhor me trouxe até aqui, obrigado Pai.

Aos meus pais, José Monteiro e Nazaré, o que seria de mim sem vocês? Obrigado meus amados, pela força, pelo amor, pelo carinho e pela dedicação, vocês são imprescindíveis na minha vida. Se hoje estou terminando o doutorado devo isso a vocês, que sempre investiram em mim, sempre me incentivaram. Eu amo vocês.

A minha esposa, Wallena, muito obrigado amor, suas palavras sempre me deram conforto, segurança e Paz. Obrigado pelo apoio, compreensão e por me aturar nos momentos de estresse, eu não conseguiria sem você. Todos os dias você me impulsiona a prosseguir. Você é a melhor esposa do mundo. Agradeço a Deus por ele ter me dado você. Eu Te amo!

A minha orientadora, Professora Elena Crespo, a senhora deixou de ser orientadora e se tornou uma grande amiga e mãe, sempre me tranquilizando nos momentos de dificuldade, muito obrigado professora, é uma honra ser seu aluno. Levarei seus ensinamentos por toda vida, a senhora me ensinou o que é fazer pesquisa de verdade e o que é ter ética. Com você aprendi a amar a pesquisa! A senhora é uma excelente orientadora. Obrigado.

Obrigado Gabriela Arrifano. Você não é apenas minha amiga, você é uma irmã. Obrigado por sempre me apoiar, “esculhambar” quando necessário, me acalmar na hora do desespero, pela amizade sincera e leal. Aprendi e aprendo muito com você ao longo desses 8 anos de amizade. Meu aprendizado não se restringe a questões pessoais, mas tb profissionais. Sua dedicação a pesquisa e capacidade de adaptação as adversidades é algo admirável. É uma honra ser seu amigo.

Obrigado Ricardo Paraense, mano assim como a Gabriela Arrifano você é um irmão. Cara não tenho palavras para descrever o quanto sou agradecido a você por todos os experimentos em que você esteve do meu lado. Nunca reclamou, nunca vi com cara feia por ficar até tarde, você é uma raridade de pessoa. Sou grato a Deus por ter você como amigo.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular que sempre foram gentis e me apoiaram em tudo que precisei. Obrigado Camila, Ericks, Flávia, Rose, Bete e Wanessa.

Agradeço a minha amiga Andrea Leal. Querida você é simplesmente incrível, obrigado por me entender e ajudar quando precisei. Você nunca me deixou na mão. Não existe no dicionário uma palavra que possa expressar o quanto sou grato a você.

Agradeço a minha amiga Lorena Azevedo, pela parceria, amizade e compreensão. Sua ajuda foi fundamental para que eu pudesse prosseguir com este trabalho. Sua preocupação e cuidado com seus professores é algo admirável. Obrigado!

Obrigado Horácio, você é um amigo precioso. Obrigado pela ajuda, compreensão e parceria durante todo este processo. Você e a Andrea são incríveis.

## RESUMO

O açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.) é uma palmeira típica do norte do Brasil, rica em compostos fenólicos e antocianinas, substâncias com elevada atividade antioxidante, anti-inflamatória e de comprovados efeitos benéficos à saúde. O estresse oxidativo e a inflamação estão envolvidos na geração e propagação de crises convulsivas, principal característica clínica da epilepsia, e na patogenia da depressão. Neste trabalho investigamos o potencial efeito neuroprotetor, anticonvulsivante e antidepressivo de amostras comerciais de açaí clarificado (AC). Apenas 4 doses de AC foram suficientes para aumentar as latências para crises convulsivas mioclônicas e tônico-clônicas e para diminuir a duração total das crises tônico-clônicas induzidas pelo Pentilenotetrazol (PTZ). Alterações eletrocorticográficas induzidas pelo PTZ foram prevenidas de forma significativa pelo AC. Já no modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS), o AC reduziu o tempo de imobilidade e aumentou significativamente o consumo de sacarose dos animais, indicando que o AC possui atividade preventiva sobre o aparecimento de comportamentos que são característicos da depressão clínica. Tanto no modelo de PTZ quanto de LPS o AC exibiu potente atividade preventiva em relação ao estresse oxidativo. O AC preveniu a peroxidação lipídica e a elevação dos níveis de nitritos no córtex cerebral, hipocampo, estriado e córtex pré-frontal. Estes resultados demonstram pela primeira vez que o açaí é uma fruta que exerce potente atividade protetora frente ao desenvolvimento de crises convulsivas, do comportamento tipo depressivo e do estresse oxidativo, o que representa uma proteção adicional para indivíduos que consomem essa fruta.

**Palavras-chave:** açaí, *Euterpe oleracea*, convulsões, PTZ, depressão, LPS, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Is a typical northern palm of Brazil, rich in phenolics and anthocyanins, substances with high antioxidant activity, anti-inflammatory and proven beneficial health effects. Oxidative stress and inflammation are involved in the generation and propagation of seizures, main clinical feature of epilepsy, and in the pathogenesis of depression. In this work we investigated the potential neuroprotective effect, anticonvulsant and antidepressant commercial samples of clarified açai (CA). Only four doses of CA were enough to increase latencies for myoclonic and tonic-clonic seizures and to reduce the total duration of tonic-clonic seizures induced Pentylentetrazole (PTZ). Eletrocorticográfics changes induced by PTZ were prevented significantly by CA. In the depressive-like behavior model induced by lipopolysaccharide (LPS), CA decreased immobility time and increased significantly the sucrose consumption of animals, indicating that the CA has preventive activity on the appearance of behaviors which are characteristic of clinical depression. Both the PTZ model as LPS CA exhibited potent preventive activity against the oxidative stress. CA prevented lipid peroxidation and elevated nitrite levels in the cerebral cortex, hippocampus, striatum and prefrontal cortex. These results demonstrate for the first time that acai is a fruit that exerts potent protective activity against the development of seizures, the depressive-like behavior and oxidative stress, which is an additional protection for individuals who consume this fruit.

Keywords: acai berry, *Euterpe oleracea*, seizures, PTZ, depression, LPS, oxidative stress.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>10</b>
2.1. Objetivo Geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>11</b>
3.1. Açaí clarificado (AC).....	11
3.2. Ensaio de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•).....	11
3.3. Animais e aspectos éticos.....	11
3.4. Tratamento dos animais com açaí.....	12
3.5. Avaliação comportamental pelo teste de Campo Aberto.....	12
3.6. Modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ).....	12
3.7. Análise comportamental das convulsões.....	13
3.8. Avaliação eletrocorticográfica.....	13
3.9. Determinação do nível de peroxidação lipídica.....	14
3.10. Conteúdo de proteína total.....	14
3.11. Modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS.....	15
3.12. Avaliação comportamental pelo teste do Nado Forçado.....	15
3.13. Avaliação comportamental pelo Teste de preferência pela sacarose.....	16
3.14. Avaliação electromiográfica.....	16
3.15. Determinação da peroxidação lipídica.....	17
3.16. Avaliação dos níveis de nitritos.....	17
3.17. Análise Estatística.....	18
<b>4. Resultados.....</b>	<b>19</b>
4.1. O açaí clarificado (AC) apresenta potente atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	<b>19</b>
4.2. O tratamento com AC não afeta a atividade locomotora espontânea dos animais tratados.....	<b>19</b>
4.3. O tratamento com AC apresenta importante atividade anticonvulsivante.....	<b>20</b>

4.3.1 O AC protege os animais contra mudanças comportamentais causadas pelas crises convulsivas.....	20
4.3.2. O tratamento com AC reduz de maneira significativa as alterações elétricas causadas pelas crises convulsivas.....	22
4.3.3. O tratamento com AC previne os efeitos deletérios do estresse oxidativo causados por convulsões no córtex cerebral.....	25
4.4. O tratamento com AC apresenta uma potente atividade antidepressiva.....	25
4.4.1. O tratamento com AC não interfere na atividade locomotora espontânea no modelo de comportamento tipo depressivo.....	25
4.4.2. O AC previne as alterações comportamentais induzidas pelo LPS.....	26
4.4.3. O tratamento com AC reduz de maneira significativa as alterações eletromiográficas causadas pelo comportamento tipo depressivo.....	28
4.4.4. O AC previne o estresse oxidativo no cérebro dos animais tratados com LPS.....	30
4.4.5. O tratamento com AC potencializa o efeito da imipramina na redução do comportamento tipo depressivo.....	33
<b>5. Discussão.....</b>	<b>34</b>
5.1. Atividade anticonvulsivante do açai.....	34
5.2 Atividade antidepressiva do açai.....	39
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>47</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Anexo I-Artigo científico intitulado “Anticonvulsant properties of <i>Euterpe oleracea</i> in mice”</b>	

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AVE	Acidente Vascular Encefálico
PTZ	Pentilenotetrazol
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
TBARS	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
MDA	Malonaldeído
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
LPS	Lipopolissacarídeo
AC	Açaí clarificado
DPPH•	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
NEED	N-naftil-etilenodiamina
ECoG	Registro eletrocorticográfico
ASC	Ácido ascórbico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Desenho experimental – modelo de crises convulsivas induzidas pelo PTZ.....	13
<b>Figura 2</b> - Desenho experimental – modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS.....	15
<b>Figura 3</b> - Atividade de sequestro do radical livre DPPH pelo ácido ascórbico (ASC) e por diluições crescentes de açaí clarificado (AC) contra os radicais livres.....	19
<b>Figura 4</b> - O tratamento com açaí clarificado (AC) não altera a atividade locomotora espontânea.....	20
<b>Figura 5</b> - Efeito de açaí clarificado (AC) nas alterações comportamentais induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ).....	21
<b>Figura 6</b> - Electrocorticogramas (ECoGs).....	22
<b>Figura 7</b> - Amplitudes eletrocorticográficas.....	24
<b>Figura 8</b> - Efeito do açaí clarificado (AC) sobre a peroxidação lipídica no córtex cerebral induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ).....	25
<b>Figura 9</b> - Os tratamentos com açaí clarificado (AC) (10 µl/g por dia - durante 4 dias, v.o.) e LPS (0,5 mg/kg, i.p.) não interferem na atividade locomotora espontânea dos animais.....	25
<b>Figura 10</b> - Efeito dos tratamentos com açaí clarificado (AC) (10 µl/g por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado.....	26
<b>Figura 11</b> - Efeito do açaí clarificado (AC) (10 µl/g por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre o consumo de sacarose no teste de preferência por sacarose.....	27
<b>Figura 12</b> – Registro eletromiográficos com suas respectivas distribuições de energia nas frequências até 50 Hz.....	28
<b>Figura 13</b> – Gráfico de distribuição de amplitude entre as frequências até 50 Hz em registros de 5 minutos da atividade muscular dos animais.....	29
<b>Figura 14</b> - Efeito do tratamento com açaí clarificado (AC) (10 µl/g por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre a peroxidação lipídica medida pelos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	30
<b>Figura 15</b> - Efeito do tratamento com açaí clarificado (AC) (10 µl/g por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de nitritos.....	31
<b>Figura 16</b> - O tratamento com açaí clarificado (AC) (10 µl/g por dia durante 4 dias, v.o.) potencializa o efeito imipramina nas doses de 5 e 10 mg/kg, na redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado.....	32

## 1 – INTRODUÇÃO

Crises convulsivas podem originar-se de eventos isolados resultantes de alterações na homeostase do cérebro induzidas por anormalidades metabólicas (por exemplo, hiperglicemia e hipocalcemia) e patologias agudas como o acidente vascular encefálico e o traumatismo craniano, nestes casos estas convulsões são ditas provocadas. Convulsões também podem ocorrer de forma espontânea (não provocada) e recorrente. Este tipo de crise convulsiva é a principal característica clínica da epilepsia, uma doença caracterizada pela persistente predisposição do cérebro para gerar crises epiléticas (Shneker e Fountain, 2003; Fisher *et al.*, 2005; Newton e Garcia, 2012).

A epilepsia é a desordem neurológica mais prevalente, acometendo mais de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo que aproximadamente 80% dessas pessoas vivem em países em desenvolvimento. Estima-se que 2,4 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com epilepsia a cada ano (OMS, 2016; Newton e Garcia, 2012).

No Brasil cerca de 1 milhão de pessoas são afetadas pela epilepsia, destas aproximadamente 380 mil não recebem tratamento adequado. A prevalência da epilepsia no Brasil é semelhante à de outros países com poucos recursos, sendo maior em pessoas menos favorecidas financeiramente e mais velhas (Noronha *et al.*, 2007).

A epilepsia não é uma patologia singular, na verdade ela caracteriza-se por ser uma grande variedade de transtornos que se refletem em uma disfunção cerebral originada através da hiperexcitabilidade dos neurônios. Essa hiperexcitabilidade conduz ao surgimento de descargas elétricas anormais que podem ser originadas por diferentes causas, e que se traduzem em diferentes sintomas, prognósticos e tratamentos (Fisher *et al.*, 2005).

A etiologia da doença varia desde anormalidades genéticas e do desenvolvimento, até lesões cerebrais induzidas pelo Acidente Vascular Encefálico (AVE) isquêmico, hemorragia intracerebral, neurotrauma, convulsões febris e infecções (Loscher e Brandt, 2010; Ravizza *et al.*, 2011; Vezzani, Aronica, *et al.*, 2011).

Estes insultos são capazes de causar a epilepsia por que induzem a reorganização de circuitos cerebrais estabelecendo assim interconexões críticas, que com o tempo, transformam-se em um foco gerador de descargas epiléticas espontâneas e recorrentes. Esse processo dinâmico através do qual um cérebro previamente assintomático torna-se capaz de gerar crises epiléticas espontâneas chama-se epileptogênese (Pitkanen e Lukasiuk, 2009; Pitkanen, 2010; Vezzani *et al.*, 2012).

As crises convulsivas (principalmente as do tipo clônicas e tônico-clônicas) apresentam efeitos devastadores para o paciente com epilepsia, pois interferem diretamente na qualidade de vida e aumentam o risco de mortalidade (Shneker e Fountain, 2003).

Além de suas consequências neurobiológicas, cognitivas, fisiológicas e sociais, a epilepsia eleva o risco para o desenvolvimento de desordens psiquiátricas. De maneira geral a prevalência da qualquer doença psiquiátrica entre pacientes epiléticos varia de 19 a 48%, sendo que existem diferenças de prevalência de acordo com o tipo de epilepsia (Gaitatzis *et al.*, 2004; Kanner, 2014).

A depressão é a comorbidade psiquiátrica mais comum em pessoas com epilepsia, afetando um em cada três pacientes. É importante destacar que pessoas com desordem depressiva também apresentam alto risco para desenvolver epilepsia, fato que demonstra o quanto essas patologias estão interligadas (Forsgren e Nystrom, 1990; Kanner, 2012; 2014).

A depressão é uma desordem mental, por muitas vezes crônica, que representa um importante e crescente problema para a saúde pública. Estima-se que 350 milhões de pessoas de todas as idades em todo mundo sejam acometidas por esta doença (OMS, 2016).

A depressão é caracterizada por sintomas como humor deprimido, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa autoestima e distúrbios do sono ou do apetite, criando um importante impacto na qualidade de vida dos pacientes e dos cuidadores. Recentemente, a depressão foi reconhecida pela Organização Mundial da saúde (OMS) como a doença que mais causa incapacidade funcional em todo mundo, sendo responsável por aproximadamente um milhão de mortes por suicídio ao ano (OMS, 2016).

No Brasil, 11,2 milhões de pessoas são afetadas por esta patologia (Ministério da Saúde, 2013). É provável ainda que este dado esteja subestimado, especialmente na região Norte, em virtude do isolamento característico de muitas comunidades dessa região (o que conduz às subnotificações de casos).

A depressão não é a principal comorbidade psiquiátrica de pacientes com epilepsia por acaso, esta relação baseia-se em mecanismos patogênicos compartilhados pelas duas patologias. Assim como nas crises convulsivas, a depressão está associada a distúrbios que envolvem neurotransmissores, estresse oxidativo e neuroinflamação, ou seja, os mecanismos patogênicos da depressão podem facilitar o processo de epileptogênese e de geração de crises convulsivas (Kanner, 2012; 2014).

Os mecanismos moleculares que promovem a hiperexcitabilidade neuronal característica das convulsões epiléticas ainda não são totalmente compreendidos. Porém, as alterações na neurotransmissão inibitória e excitatória (redução da inibição GABAérgica e

aumento da transmissão glutamatérgica), assim como canalopatias envolvendo os íons sódio, potássio, cálcio e cloreto possuem um papel primordial na etiologia das epilepsias (Badawy *et al.*, 2009b; a; Riazi *et al.*, 2010; Ghasemi e Schachter, 2011).

As mudanças moleculares, celulares e estruturais envolvidas na epileptogênese incluem a gliose, neurodegeneração, inflamação e o estresse oxidativo (Loscher e Brandt, 2010; Dudek e Staley, 2011; Pitkanen e Lukasiuk, 2011; Filibian *et al.*, 2012).

A participação do estresse oxidativo na patogênese da epilepsia tem sido evidenciada tanto em pacientes com epilepsia quanto em modelos experimentais de epilepsia e convulsão (Menon *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente as crises convulsivas que acontecem mediante a indução por agentes químicos (pilocarpina e pentilenotetrazol - PTZ) e físicos (hipertermia e estimulação auditiva) e as observadas em pacientes com epilepsia caracterizam-se pela geração exacerbada de radicais livres e consequentemente do estresse oxidativo (Aguiar *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2013).

Os elevados níveis de radicais livres associados a particular sensibilidade do sistema nervoso central ao dano oxidativo fazem do cérebro o órgão-alvo das lesões oxidativas e representa um dos principais mecanismos associados ao início e progressão da epilepsia (Waldbaum e Patel, 2010; Shin *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2012).

A alta sensibilidade do cérebro ao estresse oxidativo acontece em virtude das seguintes situações: 1) utiliza uma grande quantidade de oxigênio quando comparado a outros órgãos; 2) possui elevado conteúdo de ácidos graxo poli-insaturados, que são os alvos da peroxidação lipídica; 3) é rico em ferro que é um elemento fundamental para catalisar a formação do radical hidroxil; 4) a catalase tem baixa atividade (Shin *et al.*, 2011).

Os mecanismos implicados na geração de radicais livres pelas convulsões ainda não estão completamente compreendidos, porém acredita-se que a excitotoxicidade causada pela excessiva liberação de glutamato contribua para a formação de radicais livres e o dano oxidativo as estruturas celulares, o que pode conduzir a morte celular (Militao *et al.*, 2010; Aguiar *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2013).

A excitotoxicidade é o mecanismo pelo qual o glutamato e outros neurotransmissores excitatórios causam disfunção neuronal e neurodegeneração. Um dos mecanismos associados à patogênese da epilepsia e das crises convulsivas é o desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória (glutamatérgica) e inibitória (GABAérgica), onde há excessiva liberação de glutamato na fenda sináptica (Badawy *et al.*, 2009a; Bialer e White, 2010; Matute, 2011; Mehta *et al.*, 2013; Walls *et al.*, 2016).

A grande quantidade de glutamato na fenda sináptica promove estimulação excessiva dos receptores ionotrópicos (AMPA e NMDA) e metabotrópicos de glutamato, o que favorece o aumento do cálcio livre no citoplasma e ativação de numerosos processos cálcio-dependentes. Um destes processos é a formação excessiva de ERO por meio da ativação de enzimas como a xantina oxidase, bem como proteases, lipases e nucleases (Mehta *et al.*, 2013).

Assim como na depressão, acredita-se que a inflamação é um importante fator na etiopatogênese das convulsões (Riazi *et al.*, 2010; Vezzani, French, *et al.*, 2011; Vezzani e Ruegg, 2011).

Assim, as vias inflamatórias ativadas podem contribuir para a epileptogênese e consequentemente para a precipitação de crises espontâneas (Ravizza *et al.*, 2008; Maroso *et al.*, 2010; Riazi *et al.*, 2010; Ravizza *et al.*, 2011; Vezzani, French, *et al.*, 2011; Vezzani e Ruegg, 2011).

Os mediadores inflamatórios podem promover a redução do limiar convulsivo por meio da expressão de genes envolvidos na neurogênese, morte celular e plasticidade sináptica e molecular (Buckmaster e Dudek, 1997; O'Neill e Kaltschmidt, 1997; Pitkanen e Lukasiuk, 2009).

As convulsões por si só podem induzir a inflamação no cérebro e crises recorrentes podem perpetuar a inflamação crônica, via mecanismos que poderiam envolver a transcrição de genes inflamatórios (Vezzani, French, *et al.*, 2011; Vezzani e Ruegg, 2011).

Além disso, modelos de infecções sistêmicas ou do sistema nervoso central (SNC) sugerem que a inflamação pré-existente no cérebro aumenta a predisposição para convulsões, dessa forma eventos envolvidos na inflamação alteram a excitabilidade neuronal através de modificações pós-traducionais em receptores, canais iônicos voltagem-dependentes e da cascata de fosforilação de proteínas (Auvin *et al.*, 2007; Auvin *et al.*, 2010; Vezzani e Ruegg, 2011; Vezzani *et al.*, 2012).

Alguns dos mecanismos geradores de crises convulsivas (neuroinflamatório e oxidativo) também são evidentes na patogênese da depressão. A patogenia da depressão ainda não é bem compreendida, porém sabe-se que ele é complexa, multifatorial e resultante de interações entre fatores genéticos e ambientais (Zunszain *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2014).

A base da terapêutica atual do transtorno depressivo baseia-se principalmente na hipótese monoaminérgica. Segundo essa teoria a depressão é consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (Miller *et al.*, 2009).

Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos usados atualmente na clínica, uma vez que a grande maioria dos medicamentos antidepressivos disponíveis aumentam ou modulam a neurotransmissão monoaminérgica (Mello *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2014).

Apesar da importância dessa hipótese para a terapia atual, alguns questionamentos ainda permanecem, por exemplo: “existem mecanismos patogênicos adicionais que poderiam contribuir para a elevada taxa de refratariedade (até 30%) ao tratamento com antidepressivos que atuam na via monoaminérgica?” (Miller, Maletic e Raison, 2009). Assim, outras teorias têm sido propostas para explicar a patogênese da depressão (exposição ao estresse, disfunção do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e alterações na neurogênese, entre outras) (Miller *et al.*, 2009; Zunszain *et al.*, 2011; Eyre e Baune, 2012a; Hannestad *et al.*, 2013).

Entretanto, estudos recentes em humanos e com modelos animais de depressão coincidem em destacar a inflamação e o estresse oxidativo como vias moleculares importantes para o desenvolvimento da depressão (Maes, 2008; Miller, Maletic e Maison 2009; Black *et al.*, 2015; Eyre, 2013). Ainda, alguns trabalhos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado recentemente que drogas antidepressivas são capazes exercer atividade anti-inflamatória modulando a ativação microglial, a produção de TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico (NO) (Tynan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Ohgi *et al.*, 2013).

A neuroinflamação é reconhecidamente uma via comum na patogênese de uma série de doenças neurológicas (epilepsia e esclerose, entre outras) e desordens neuropsiquiátricas, como é o caso da depressão (Monif *et al.*, 2010).

O recente interesse da relação entre o sistema imunológico e a depressão deve-se ao aumento dos biomarcadores inflamatórios associados a depressão (Capuron e Miller, 2011).

A relação inflamação/depressão tem sido evidenciada por meio de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue, fluido cérebro espinal e em cérebros post-mortem de pacientes com depressão e em modelos animais da doença. Entre os mediadores imunológicos frequentemente aumentados cabe destacar o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), a IL-6, a IL-1 $\beta$  e a proteína C reativa (Dowlati *et al.*, 2010).

As citocinas pró-inflamatórias podem influenciar vários aspectos da função cerebral que incluem: metabolismo de neurotransmissores (por exemplo, serotonina e noradrenalina - o que resulta na disfunção destes neurotransmissores), função neuroendócrina, plasticidade sináptica, neurocircuitos que participam da regulação do humor, atividade motora, motivação e ansiedade. Em virtude da sua ampla capacidade de influência, a inflamação é considerada

uma importante via na fisiopatologia da depressão (Miller *et al.*, 2009; Capuron e Miller, 2011; Eyre e Baune, 2012b; Eyre *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2014).

Assim, um modelo já bem estabelecido para o estudo do comportamento depressivo é aquele induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina bacteriana que ativa o sistema imune inato (Capuron e Miller, 2011; Ji *et al.*, 2014; Tomaz *et al.*, 2014).

Nesse modelo, os animais expressam padrões comportamentais depressivos em virtude da elevação de citocinas pró-inflamatórias (Dantzer *et al.*, 2008; Capuron e Miller, 2011; Ji *et al.*, 2014; Tomaz *et al.*, 2014).

Os mediadores pró-inflamatórios (citocinas) produzem uma série de alterações bioquímicas e comportamentais em roedores. Neste modelo animal para o estudo da depressão é observado inicialmente um comportamento denominado “*sickness behavior*” (comportamento de doente – que ocorre de 2-6 horas após a administração do LPS) e que após 24 horas a administração do LPS evolui para o comportamento tipo depressivo, caracterizado por anedonia, redução na locomoção, alimentação e interação social. Estes comportamentos são semelhantes aos observados em pacientes com depressão maior (Dantzer *et al.*, 2008; Tomaz *et al.*, 2014).

Além de sua contribuição direta no comportamento, a neuroinflamação também exerce influência negativa sobre o tratamento da depressão uma vez que a IL-1 $\beta$  é capaz de promover resistência ao tratamento com fluoxetina em modelo animal de epilepsia associada à depressão (Pineda *et al.*, 2012).

A neuroinflamação também é capaz de reduzir a neuroplasticidade hipocampal (neurogênese, plasticidade sináptica e a potenciação de longa duração) e a perda de elementos gliais, e ainda permite que o glutamato e os metabólitos do triptofano alcancem níveis neurotóxicos gerando estresse oxidativo (Miller *et al.*, 2009; Eyre *et al.*, 2013).

Assim como na inflamação, o estresse oxidativo também está envolvido na fisiopatologia de muitas desordens neuropsiquiátricas como esquizofrenia, desordem bipolar, epilepsia, crises convulsivas e depressão maior. Estudos em humanos com depressão e em modelos animais desta doença mostram que os marcadores do estresse oxidativo (substância reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS), malonaldeído (MDA), 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) e F2-isoprostano) estão aumentados enquanto que as defesas antioxidantes (vitamina E, zinco, coenzima Q10, glutathione peroxidase) estão reduzidas (Maes *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2013; Pandya *et al.*, 2013; Zhang e Yao, 2013; Palta *et al.*, 2014; Black *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio produzido por uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e/ou uma capacidade diminuída da defesa antioxidante (Cardenas-Rodriguez *et al.*, 2013; Folbergrova, 2013).

Entre os componentes que fazem parte dos sistemas de defesa contra a agressão oxidativa destaca-se a enzima catalase que é considerada o maior componente da defesa antioxidante primária, uma vez que sua função é catalisar a decomposição  $H_2O_2$  em água. A catalase divide esta função com a glutathiona peroxidase e a ação conjunta dessas enzimas é fundamental para o balanço redox (Lopez *et al.*, 2007; Cardenas-Rodriguez *et al.*, 2013).

É relevante destacar que a geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, que cumpre importantes funções biológicas (sinalização celular e defesa contra microrganismos), porém passam a representar perigo para os diversos órgãos quando eles alcançam níveis elevados.

Em situações em que os sistemas de defesa antioxidante tornam-se ineficazes os EROs e ERNs são capazes de promover a oxidação de biomoléculas (proteínas, carboidratos, lipídios, ácido nucléicos) o que acarreta a perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (Folbergrova, 2013; Zhen *et al.*, 2014).

Os elevados níveis de radicais livres associados à particular sensibilidade do sistema nervoso central ao dano oxidativo faz do cérebro o órgão-alvo das lesões oxidativas (Lee *et al.*, 2013).

Os mecanismos patogênicos operantes na depressão podem contribuir para facilitar o processo de epileptogênese e de hiperexcitabilidade cortical em humanos e em modelos animais de depressão. Teoricamente estes fatos podem justificar a elevada incidência de convulsões epiléticas em pacientes depressivos (incidência é 19 vezes mais elevada quando comparada a população em geral) (Alper *et al.*, 2007; Kanner, 2011; 2014).

Outro fator preocupante na comorbidade entre epilepsia e depressão é a taxa de suicídio (9 a 25 vezes maior em pacientes com epilepsia) e o impacto negativo da depressão sobre o tratamento farmacológico e cirúrgico da epilepsia (Kanner, 2001; 2011; 2014).

Estes dados são preocupantes, pois um dos maiores problemas em relação à epilepsia é o tratamento. Cerca de 75% pacientes epiléticos que vivem nos países em desenvolvimento não recebem tratamento adequado e aproximadamente 30% dos pacientes são refratários a terapia atual, ou seja, continuam tendo crises convulsivas (Bialer e White, 2010; OMS, 2016).

Pacientes epiléticos com crises recorrentes (refratários ou que não recebem o tratamento adequado) apresentam prevalência de depressão que varia de 20 a 55%, já nos

pacientes com crises controladas por medicamentos a prevalência cai para 3 a 9% (Gilliam *et al.*, 2004).

A refratariedade terapêutica não é uma exclusividade da epilepsia uma vez que 30-50% dos pacientes com depressão não respondem ao tratamento antidepressivo (Hodes *et al.*, 2015). Apesar do tratamento atual da depressão (baseado essencialmente na hipótese monoaminérgica, como vimos acima) ser eficaz em muitos casos de depressão, a OMS calcula que menos da metade das pessoas afetadas no mundo (em alguns países, menos de 10%) recebem o tratamento adequado (OMS, 2016). Entre as causas apontadas cabe destacar a falta de recursos e o difícil acesso das populações a um tratamento.

Por meio dos fatos é possível observar que a comorbidade epilepsia/depressão interfere de maneira negativa na qualidade de vida do paciente, o que exige da ciência a pesquisa e descobertas de novas terapias.

O ponto de partida para descobrir novas abordagens terapêuticas para as convulsões e a depressão é compreender a patogênese dessas condições. Considerando o importante papel do estresse oxidativo e da inflamação no quadro depressivo e na geração de crises convulsivas é necessário avaliar como compostos com elevada capacidade anti-inflamatória e/ou antioxidante funcionam em modelos de crises convulsivas e de depressão (Muszynska *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015).

Esse quadro é especialmente importante para a região Norte do Brasil, onde o isolamento geográfico das populações unido à riqueza biológica da Amazônia torna essencial o estudo dos produtos naturais de fácil acesso e consumidos por essas populações, especialmente no marco das doenças crônicas neurológicas. A Amazônia nos permite criar propostas à base de compostos bioativos na dieta ou de produtos naturais para prevenir e/ou melhorar os eventos deletérios existentes no quadro depressivo e convulsivo (Muszynska *et al.*, 2015).

O açaí é o fruto proveniente do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), que é a palmeira mais produtiva em ecossistema de várzea, típica do Norte do Brasil. O açaí é nativo da Amazônia, sendo o estado do Pará o principal centro de dispersão natural dessa palmácea (Rogez, 2000; Nogueira *et al.*, 2005).

Atualmente o açaí também vem ganhando espaço no mercado internacional, com grande apelo funcional, por ser um alimento exótico e rico em compostos fenólicos e antocianinas, substâncias com elevada capacidade antioxidante e de comprovados efeitos benéficos à saúde, quando presentes na dieta humana (Kang *et al.*, 2011; Gordon *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2015).

O açaí clarificado é um produto aquoso, caracterizado pela redução de sólidos insolúveis e lipídios, mas mantendo um alto conteúdo em compostos fenólicos (como antocianinas, flavonas, proantocianidinas e outros flavonoides) e que está amplamente disponível no mercado internacional para consumo humano (Bichara e Rogez, 2011). Todos esses compostos outorgam uma elevada capacidade antioxidante ao açaí.

Além da sua notável capacidade antioxidante, estudos recentes estão demonstrando que o açaí também apresenta atividade anti-inflamatória.

Apesar dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório serem bem relatados em estudos *in vitro* (Kang et al., 2011; Xie et al., 2011; Moura et al., 2012), em estudos *in vivo* com o açaí ainda são escassos, especialmente aqueles relacionados a doenças neurológicas.

Considerando as evidências que apontam para a participação do estresse oxidativo na patogênese da depressão e na geração de crises convulsivas e a elevada atividade antioxidante do açaí, este trabalho tem por objetivo investigar o possível efeito neuroprotetor, anticonvulsivante e antidepressivo do açaí em modelos animais.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

- Avaliar se o açaí clarificado é capaz de exercer atividade anticonvulsivante ou antidepressiva nos modelos de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol e de comportamento tipo depressivo induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS).

### 2.2 - Objetivos Específicos

- Determinar a atividade antioxidante do açaí clarificado por meio de ensaio *in vitro*;
- Determinar possível ação ansiolítica do açaí clarificado através do teste de Campo Aberto
- Investigar a influência do tratamento com açaí clarificado no modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) através de parâmetros:
  - Comportamentais:
    - Latência para o aparecimento do primeiro espasmo mioclônico
    - Latência para o aparecimento da primeira convulsão tônico-clônica
    - Tempo total em convulsão
  - Eletrocorticográficos
  - De estresse oxidativo no córtex (níveis de peroxidação lipídica)
- Estudar o possível efeito neuroprotetor do tratamento com açaí clarificado no modelo de comportamento tipo depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS) através de parâmetros:
  - Comportamentais
    - Teste de Nado Forçado
    - Teste de preferência pela sacarose (anedonia)
  - Electromiográficos
  - De estresse oxidativo no córtex fronto-parietal, hipocampo e corpo estriado:
    - Níveis de peroxidação lipídica
    - Níveis de nitritos
- Verificar o uso do açaí clarificado como adjuvante na terapia contra depressão através da possível potencialização do efeito antidepressivo da imipramina no modelo de comportamento tipo depressivo;

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Açaí clarificado (AC)**

As plantas foram identificadas como *E. oleracea* Martius (Arecaceae), por meio de comparação com amostras de referência (#268513) depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA, Brasil). As amostras de AC foram gentilmente cedidas pela Amazon Dreams (Belém, Pará, Brasil). O AC foi produzido por um processo patenteado, licenciado pela Amazon Dreams e UFPA (PI 1003060-3) e que consiste na microfiltração e centrifugação da polpa de açaí, preparada com frutas frescas. Conseqüentemente, o produto final não possui mais lipídios, proteínas e fibras (os sólidos totais são menos de 1% da matéria seca) e constitui um modelo ideal para avaliar o impacto de compostos fenólicos (>1400 equivalentes de Ácido Gálico/L).

#### **3.2 - Ensaio de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)**

Para avaliar a atividade antioxidante do AC, foi utilizado o método de sequestro do radical estável DPPH• conforme o protocolo descrito por (Gulcin *et al.*, 2004). Resumidamente, diluições de AC (1:10, 1:100, 1:1000) foram adicionadas a solução de 40 µg/ml de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) em etanol. Depois de 30 minutos de incubação ao abrigo da luz em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 517 nm e a percentagem de moléculas de DPPH sequestradas foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: % scavenged DPPH=[(A<sub>0</sub> - A<sub>1</sub>)/A<sub>0</sub>] x 100, onde A<sub>0</sub> é a absorbância do grupo controle e A<sub>1</sub> é a absorbância na presença de AC.

#### **3.3 - Animais e aspectos éticos**

Os animais utilizados foram camundongos Swiss machos (20-30 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Pará. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (21± 2°C) e de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), e com livre acesso a água e ração.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) da Universidade Federal do Pará (números de licença BIO197-14 e BIO089-15) e seguiu as orientações sugeridas pelo Guia NIH para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

Os animais destinados ao registro eletrocorticográfico foram submetidos a procedimentos cirúrgicos antes de qualquer tratamento. Nenhum animal morreu naturalmente (sem a eutanásia) por meio dos tratamentos realizados. Todos os procedimentos

metodológicos relacionados aos animais tiveram o objetivo de reduzir a quantidade e o sofrimento dos mesmos no presente estudo.

### **3.4 - Tratamento dos animais com AC**

Os animais foram tratados com AC ou salina (10 µl/g de peso corporal) por gavagem diariamente durante quatro dias. Uma hora depois da última dose de AC ou salina, cada modelo experimental (convulsão ou depressão) foi induzido com injeção intraperitonealmente de PTZ (60mg/kg) ou LPS (0,5 mg/Kg) (Fig.1 e Fig. 2).

### **3.5 - Avaliação comportamental pelo teste de Campo Aberto**

Um conjunto de 20 animais (grupos AC e controle) foi avaliado pelo teste de campo aberto para analisar possíveis alterações na atividade locomotora espontânea provocadas pelo tratamento com açai. A análise da atividade locomotora espontânea pelo teste de campo aberto foi realizada entre as 8:00-12:00h. Os animais foram alojados em uma caixa de madeira (com o piso demarcado por linhas escuras em 12 quadrantes de áreas iguais) e observados por 5 minutos. Os parâmetros observados durante a análise foram: número de quadrantes cruzados com as quatro patas (locomoção espontânea), número de comportamentos de autolimpeza (grooming), número de levantamentos (rearing), defecação. Estes parâmetros foram registrados durante um tempo de 5 minutos, após 1 minuto de habituação (Rodrigues *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2013).

### **3.6 - Modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)**

Os outros animais foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com uma única dose de PTZ (60 mg/kg) (Souza *et al.*, 2013) ou solução salina. As análises comportamentais das convulsões e as gravações eletrocorticográficas foram realizadas com monitoramento contínuo de 20 e 30 minutos, respectivamente (Fig. 1).

Os animais submetidos às análises de estresse oxidativo foram posteriormente sacrificados por deslocamento cervical e o córtex total foi congelado em nitrogênio líquido e imediatamente acondicionado a -80 °C.

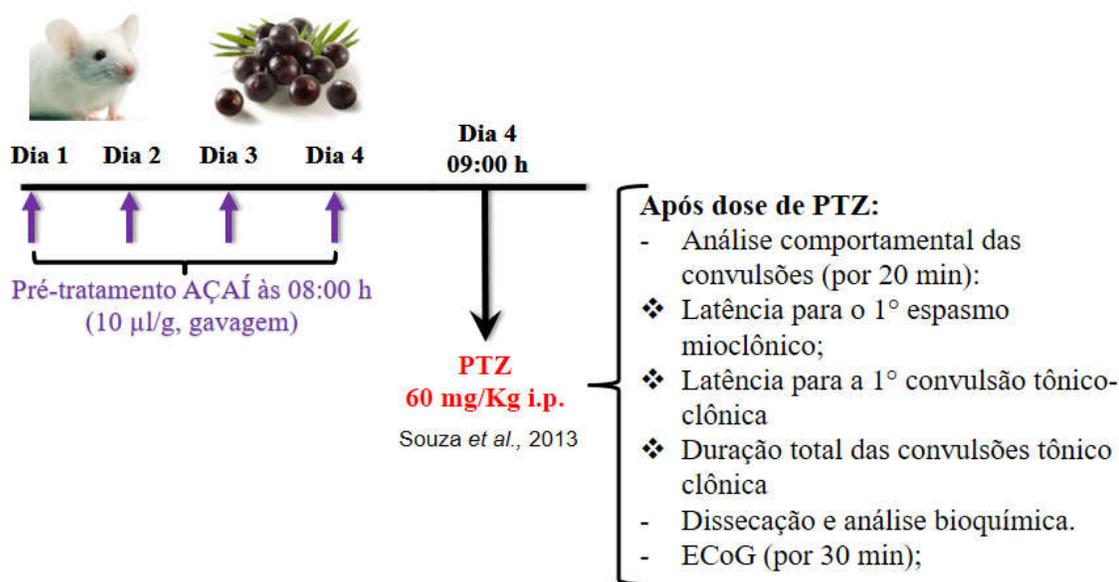


Fig. 1. Desenho experimental – modelo de crises convulsivas induzidas pelo PTZ

### 3.7 - Análise comportamental das convulsões

Depois da injeção de PTZ (60mg/kg, i.p.), os animais foram continuamente monitorados por vinte minutos (Fig. 1). Durante este período as latências para o primeiro espasmo mioclônico, para a primeira convulsão tônico-clônica generalizada, bem como a duração total das crises tônico-clônicas foram mensuradas (Souza *et al.*, 2013).

### 3.8 - Avaliação eletrocorticográfica

Um grupo diferente de animais (n=16) foi anestesiado com Xilazina (5 mg/kg i.p.) e quetamina (80mg/kg i.p.). Após apresentar perda de reflexo interdigital o animal foi fixado no aparelho estereotáxico, para a implantação dos eletrodos. Após a aplicação subcutânea de lidocaína a 2% no local da incisão cirúrgica, os eletrodos (1 mm de diâmetro) foram implantados obedecendo as coordenadas 1 mm posterior para bregma, ± 1 mm latero-lateral (de ambos os hemisférios), acomodados na duramater, fixados e isolados com acrílico autopolimerizante. Os animais foram então monitorados a cada 6 horas e permaneceram em recuperação por um período de 2 dias. Passada a recuperação os animais foram submetidos aos tratamentos descritos acima com AC ou salina. No último dia de tratamento, os eletrodos de cada animal foram conectados a um sistema de aquisição de dados (amplificador de alta impedância - Grass Technologies, P511; acoplado a um osciloscópio - Protek, 6510). O eletrodo de registro estava localizado no lado direito do hemisfério, e do lado esquerdo o eletrodo de referência. Todo o experimento foi executado dentro da gaiola de Faraday. Os

dados foram continuamente digitalizados em uma taxa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX) e processados através do software LabVIEW express.

Após 10 minutos de acomodação, foi feito o registro de cada animal em estado basal durante 30 min e, em seguida foi administrado PTZ e/ou salina como descrito acima. O tempo total de registro para cada animal foi de 30 minutos (Fig. 1).

Os dados foram graficamente expressos mostrando a diferença de potencial entre os eletrodos de referência e registro. Os espectrogramas foram calculados usando uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro a densidade de potência espectral (PSD) foi calculada pelo método periodograma média de Welch. O histograma de frequência foi gerado pelo primeiro cálculo do PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição, com o PSD, resultando um histograma construído com caixas de 1 Hz.

### **3.9 - Determinação do nível de peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica das amostras de córtex total foi determinada de acordo com (Esterbauer e Cheeseman, 1990). Resumidamente, após a centrifugação das amostras (2500 g por 10 minutos a 4°C), uma solução contendo ácido metanosulfônico e N-metil-2-fenilindol (NMFI) (em 10.3 mM acetonitrila) diluída em metanol (1:3) foram adicionados ao sobrenadante e incubadas por 40 min a 45°C. A absorbância foi mensurada a 570 nm e comparadas com as concentrações padrões de malonaldeído (MDA). Os valores foram corrigidos pelo conteúdo de proteínas totais em cada amostra e expressos em nanomoles de MDA/mg de proteínas.

### **3.10 - Conteúdo de proteína total**

O conteúdo total de proteínas foi determinado em todas as amostras como descrito por (Bradford, 1976). Aliquotas dos homogeneizados foram incubados com o reagente de Bradford (5% de etanol, 8,5% ácido fosfórico, 0,25% de Azul Brilhante de Coomassie G-250) durante 2 minutos em temperatura ambiente. A absorbância de cada amostra foi medida a 595 nm e comparada com soluções padrão de albumina sérica bovina (BSA).

### 3.11 - Modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS

Após o tratamento com AC, imipramina ou salina uma única dose de LPS (0,5 mg/Kg) foi injetada nos animais por via intraperitoneal para indução do modelo de comportamento tipo depressivo. Os animais foram submetidos a avaliações comportamentais (campo aberto, nado forçado, teste de preferência pela sacarose e eletromiografia) 24 horas após da administração do LPS, período no qual o comportamento tipo depressivo é observado (Mello *et al.*, 2013; Tomaz *et al.*, 2014) (Fig. 2).

Os animais submetidos às análises de estresse oxidativo foram sacrificados por deslocamento cervical e as áreas de cérebro dissecadas (córtex total, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) foram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente acondicionados a -80 °C.

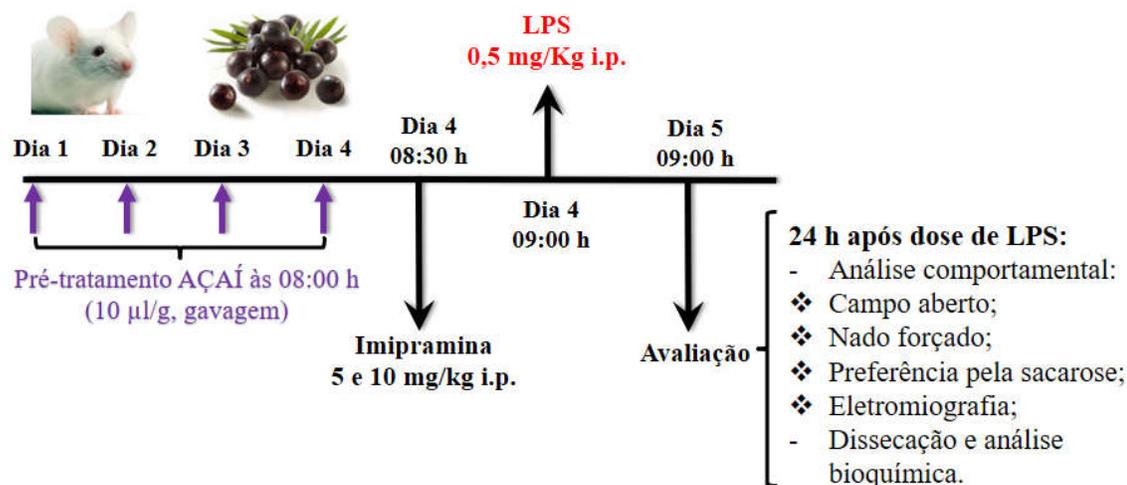


Fig. 2. Desenho experimental – modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS

### 3.12 - Avaliação comportamental pelo teste do Nado Forçado

Os camundongos foram individualmente colocados em um cilindro acrílico (25 cm de altura e 10 cm de diâmetro) contendo água a uma temperatura entre 22 a 24°C. Após um minuto de habituação, os animais foram avaliados quanto ao tempo de imobilidade (em segundos) por um período de 5 minutos. A imobilidade é definida como ausência de comportamentos ativos como natação, saltos, rearing ou mergulho (Mello *et al.*, 2013). Os animais que apresentarem dificuldade em manter a cabeça acima da água foram retirados do cilindro e excluídos do estudo.

### 3.13 - Avaliação comportamental pelo teste de preferência pela sacarose

A verificação da anedonia ocorreu 24 horas depois da administração do LPS, conforme descrito por (Tomaz *et al.*, 2014). Para a realização deste procedimento os animais foram submetidos a um período de adaptação de 72 horas antes da realização do teste. Este período consiste na adaptação dos animais a solução de sacarose 1% colocada em duas garrafas para cada gaiola. Vinte e quatro horas depois uma das garrafas de sacarose 1% foi substituída por uma garrafa contendo apenas água (mantida por 24 horas), assim cada gaiola ficou com uma garrafa com sacarose 1% e outra garrafa contendo apenas água. Passada a adaptação os animais ficaram sem água e alimento por 24 horas. Após adaptação o teste foi realizado e os animais foram alojados em gaiolas individuais com livre acesso a duas garrafas, uma contendo sacarose 1% e outra apenas água (cada garrafa com volume de 100 ml). Depois de 1 hora do início do teste os volumes consumidos foram registrados e a preferência pela sacarose calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de ingestão de sacarose} = \frac{\text{Consumo de Sacarose}}{(\text{Consumo de água} + \text{Consumo de Sacarose})} \times 100$$

### 3.14 – Avaliação eletromiográfica

Vinte animais (machos adultos), divididos em 5 por grupo, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais em ambiente com temperatura regulada (25-28°C) e ciclo claro – escuro de 12 horas. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*.

Após o tratamento como descrito no item 3.11, foram implantados eletrodos conjugados em aço inox no músculo semitendinoso no lado direito dos membros dos animais para a aquisição dos registros eletromiográficos. Após o procedimento de implante de eletrodo, os eletrodos foram conectados a um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, P511), monitorado por um osciloscópio (Protek, 6510) e os dados foram continuamente digitalizados em uma taxa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX).

Os dados foram armazenados em disco rígido e processados através de um software especializado (LabVIEW express). Todo o experimento foi executado dentro da gaiola de Faraday. A duração dos registros foi de 5 minutos para cada animal.

Para as análises dos sinais adquiridos, uma ferramenta foi construída usando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca Matplotlib para os gráficos. A interface

gráfica foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4. Os gráficos de amplitude demonstram a diferença de potencial entre os eletrodos de referência e de registro. Nos sinais foram observadas 1000 amostras por segundo.

Os espectrogramas foram calculados usando uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro a densidade de potência espectral (PSD) foi calculada pelo método periodograma média de Welch.

O histograma de frequência foi gerado pelo primeiro cálculo do PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição, com o PSD, resultando um histograma construído com caixas de 1 Hz. Para analisar a diferença entre os experimentos, um gráfico com a média e desvio padrão de PSD de vários experimentos foi construído, cada onda do gráfico foi gerada a partir de um conjunto de testes, onde o PSD foi gerado e calculado a média e o desvio padrão de cada grupo, para o cálculo da janela PSD Hamming foi usado 256 pontos sem sobreposição.

### **3.15 - Determinação da peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi avaliada por determinação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenatos das áreas cerebrais estudadas (Mello *et al.*, 2013). As amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético a 10% (TCA) e 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (TBA), em seguida, as amostras foram incubadas por 45 min a 90°C e dado este tempo foram mantidas em banho de gelo. A peroxidação lipídica foi avaliada pela absorbância em 532 nm e expressa em micromoles de malonaldeído (MDA)/g de tecido.

### **3.16 - Avaliação dos níveis de nitritos**

A determinação dos níveis de nitritos foi baseada no método descrito por (Green *et al.*, 1982). Resumidamente, 100 µl de sobrenadante foi incubado com 100 µl do reagente de Griess, que consiste em partes iguais (1:1:1:1) de 1% de sulfonamida dissolvida em 1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% N-naftil-etilenodiamina (NED) e água destilada em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi mensurada em 560 nm no leitor de microplacas. O conteúdo de nitrito foi determinado a partir de uma curva padrão de nitrito gerada utilizando NaNO<sub>2</sub> (com intervalo de 0.75-100 mM) como padrão e expressa como micromoles de nitrito/mg de tecido.

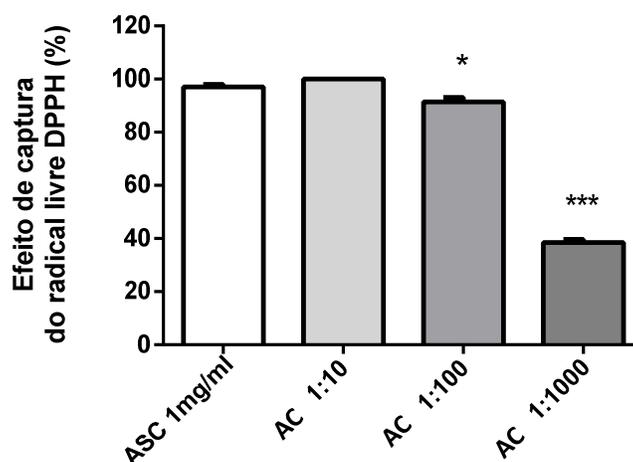
### 3.17 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do GraphPad Prism (versão 5.0). Inicialmente a normalidade (i.e. distribuição gaussiana) de cada grupo de dados foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Dados não-paramétricos foram expressos como medianas  $\pm$  intervalos interquartis e analisados usando o teste de Mann-Whitney (para dois grupos) ou Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* Dunn, se adequado (para 3 ou mais grupos). Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados pelo teste t de Student (para dois grupos) ou ANOVA seguido pelo teste *post hoc* Tukey ou Student-Newman-Keuls, quando apropriado (para 3 ou mais grupos). Foi considerado significativo um  $P < 0,05$  para todas as análises.

## 4 - RESULTADOS

### **4.1 - O açaí clarificado (AC) apresenta potente atividade antioxidante *in vitro***

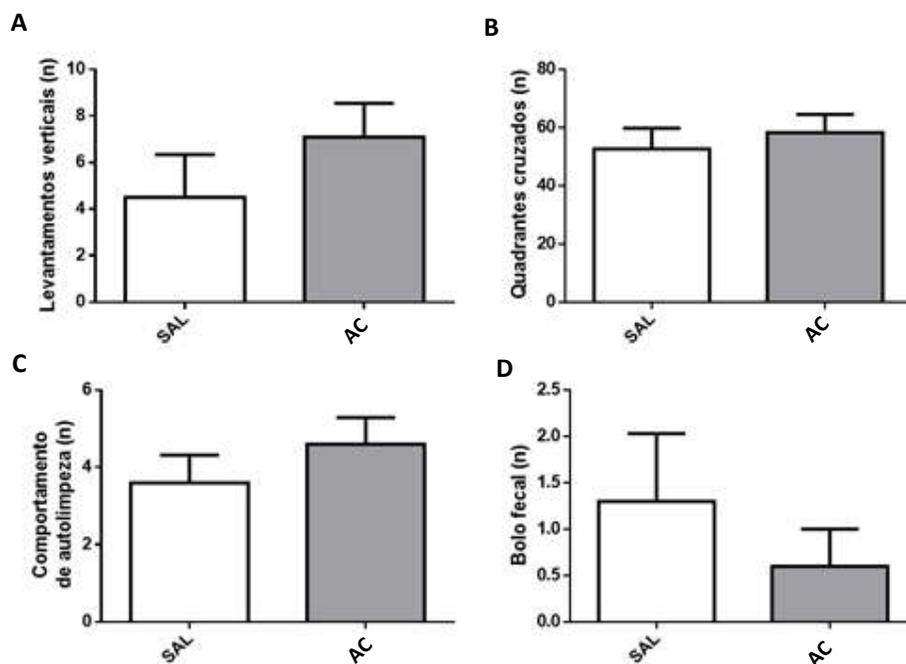
A elevada capacidade antioxidante do AC foi detectada pelo método de DPPH• (Fig. 3). A capacidade AC em sequestrar o radical estável DPPH• foi potente, uma vez que a diluição de 1:10 de açaí foi suficiente para mostrar um efeito similar como o ácido ascórbico (1 mg/ml).



**Fig. 3.** Atividade de sequestro do radical livre DPPH pelo ácido ascórbico (ASC) e por diluições crescentes de açaí clarificado (AC) contra os radicais livres. ASC e AC foram incubadas com a solução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Os dados são representados por média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). \*\*\* P < 0,001 vs todos os grupos. \* P < 0,05 vs AC 1:10 e ASC de 1 mg / ml.

### **4.2 - O tratamento com AC não afeta a atividade locomotora espontânea dos animais tratados**

Não houve diferença estatística entre os animais tratados com solução salina ou AC nos parâmetros analisados no teste de campo aberto (Fig. 4).

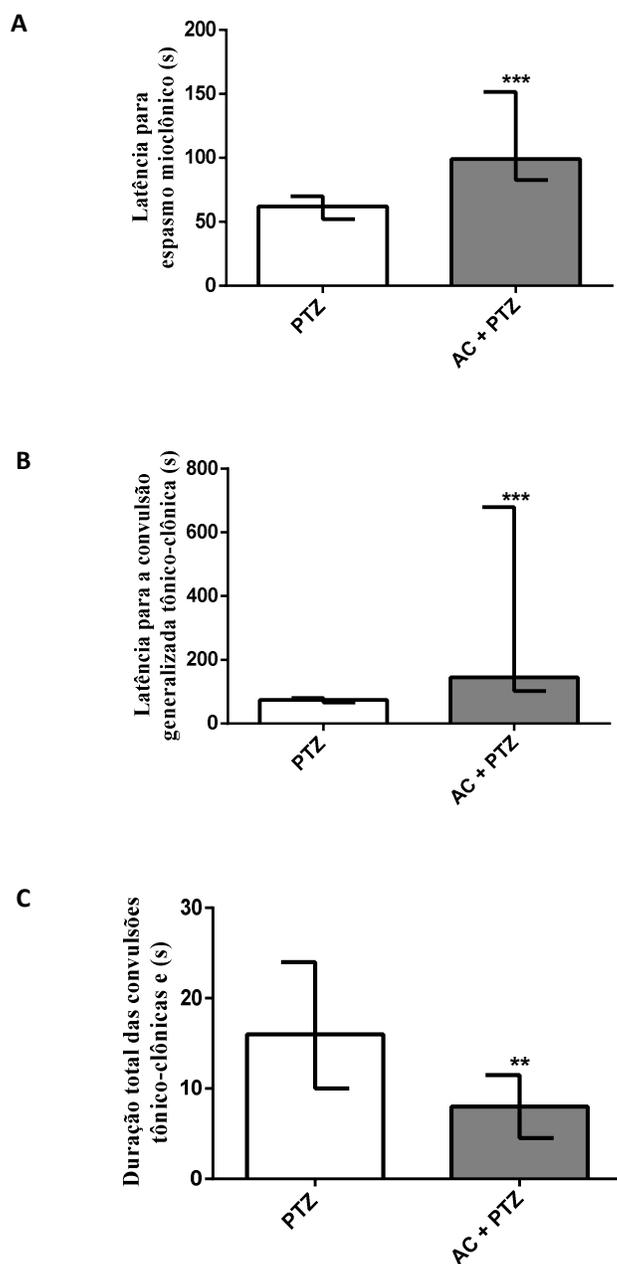


**Fig. 4.** O tratamento com açá clarificado (AC) não altera a atividade locomotora espontânea. AC ou solução salina (SAL) foi administrado por gavagem (10  $\mu$ l/g por dia) durante 4 dias. Dados do número de levantamentos verticais (A), número de quadrantes cruzados (B), número de atos de autolimpeza (C) e número de bolos fecais (D). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão (n=10). Não foram detectadas diferenças estatísticas.

### **4.3 O tratamento com AC apresenta importante atividade anticonvulsivante**

#### **4.3.1 - O AC protege os animais contra mudanças comportamentais causadas pelas crises convulsivas**

Apenas quatro doses de AC foram suficientes para aumentar significativamente as latências para primeiro espasmo mioclônico e para a primeira convulsão generalizada tônico-clônica induzida pelo PTZ (Fig. 5A e B). O tratamento com AC também diminuiu em 61% a duração total das crises generalizadas tônico-clônicas (Fig. 5C).



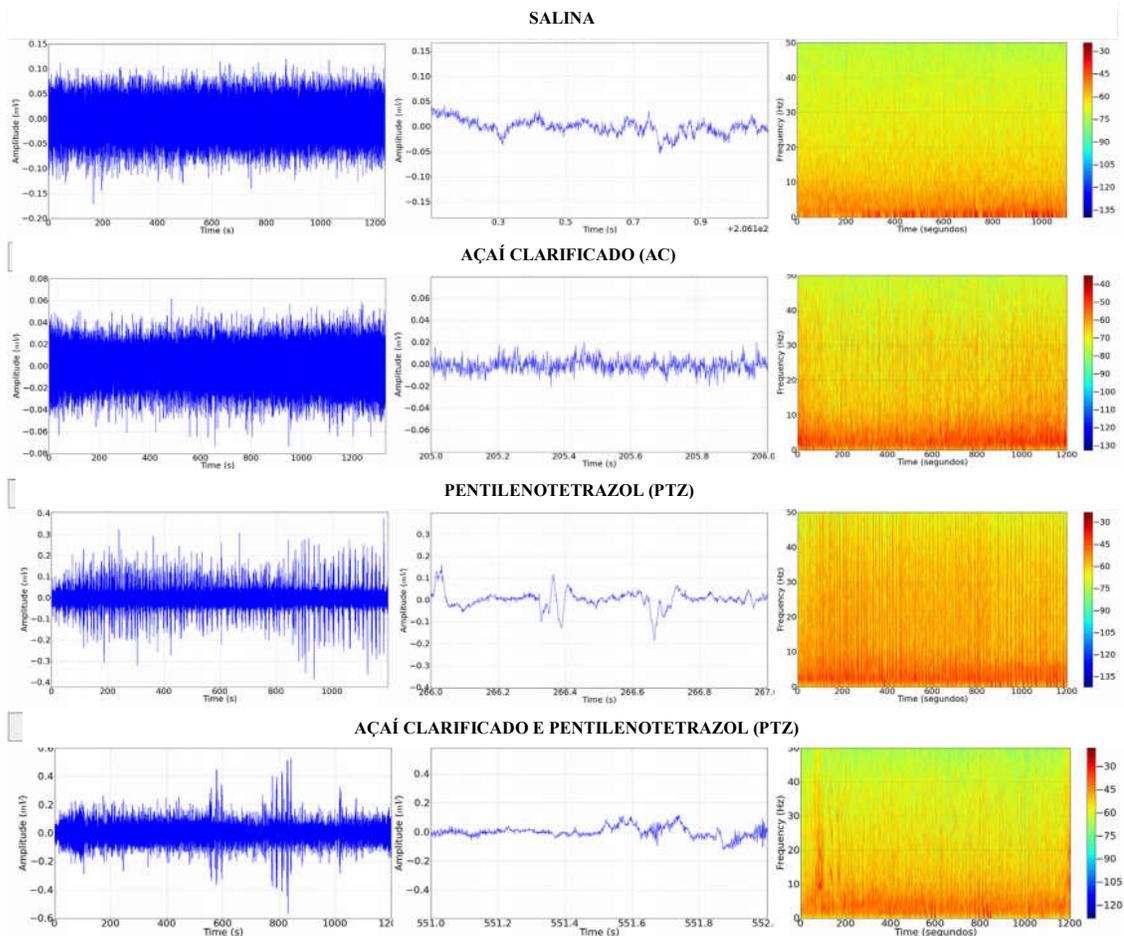
**Fig. 5.** Efeito de açai clarificado (AC) nas alterações comportamentais induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ): latência para o primeiro espasmo mioclônico (A), a latência para primeira crise tônico-clônica generalizada (B) e o tempo total em crises tônico-clônicas generalizadas (C). O AC foi administrado por gavagem (10  $\mu$ l/g por dia) durante 4 dias. A dose de PTZ foi de 60 mg/kg i.p. Os dados estão expressos como mediana e intervalo interquartil (n=10). \*\*\* P < 0,001 e \*\* P < 0,01 vs PTZ.

#### **4.3.2 - O tratamento com AC reduz de maneira significativa as alterações elétricas causadas pelas crises convulsivas**

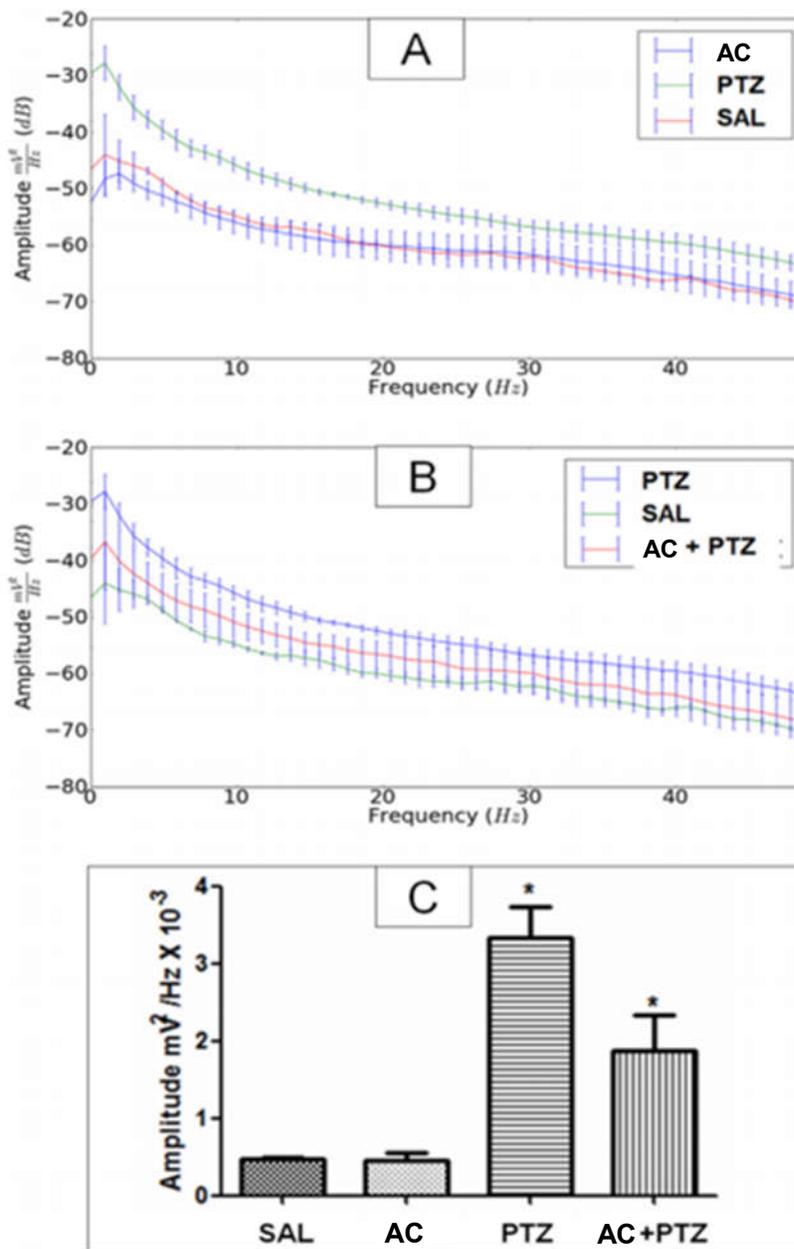
O registro eletrocorticográfico (ECoG) dos animais tratados com solução salina indica atividade cerebral referente a exploração do ambiente de registro, onde a amplificação do registro revelou um traçado irregular caracterizado por apresentar atividade cerebral de baixa amplitude, com atividade cerebral mais intensa nas frequências abaixo de 10 Hz. O ECoG de animais tratados com AC foi muito semelhante aquele dos animais controle (Fig. 6), com baixas amplitudes e frequências abaixo de 10 Hz.

A administração do PTZ provocou um padrão variável de amplitudes e a presença de salva de potenciais indicando maior variação na atividade cerebral, compatível com a excitabilidade provocada pelo quadro convulsivo (Fig. 6). O espectrograma para estes animais demonstra maior distribuição de força nas frequências até 50 Hz. O registro dos animais do grupo AC+PTZ demonstrou potenciais de campo de baixa amplitude, que são significativamente menores do que os provocados pelo PTZ, o que representa a inibição parcial do efeito do PTZ (Fig. 6). Os espectrogramas destes animais apresentaram distribuições de energia com poucas frequências acima de 10 Hz.

No que diz respeito às distribuições de amplitude (Fig. 7), não foram encontradas diferenças significativas nas distribuições de frequências de 1 a 50 Hz entre animais tratados com solução salina ou AC (Fig. 7). No entanto, o PTZ causou um aumento significativo nas amplitudes com um padrão de distribuição alterado claramente. O tratamento com AC diminuiu a amplitude de disparo principalmente nas frequências mais baixas (especialmente nas frequências de 1 a 25 Hz), o que indica a diminuição da capacidade do PTZ em deflagrar as convulsões (Fig. 6). Além disso, a quantificação das amplitudes para cada grupo revelou um aumento significativo após o tratamento com PTZ, que diminuiu aproximadamente 50% quando foi realizado o tratamento com quatro doses de AC (Fig. 7).



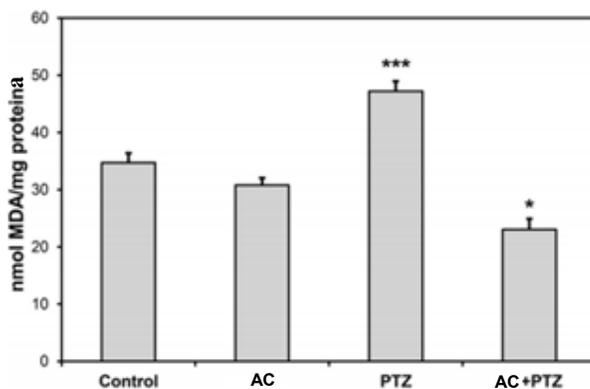
**Fig. 6.** Electroencefalogramas (ECoGs). Os animais foram tratados com solução salina (primeira linha) ou AC (10  $\mu$ l/g por dia via gavagem) (segunda linha) durante 4 dias e em seguida tratada com pentilenotetrazol (60 mg / kg) (terceira e quarta linhas, respectivamente). ECoG realizado no tempo de 20 minutos por animal (esquerda), amplificação de um fragmento representativo de ECoGs (centro) e espectrogramas de frequências (direita).



**Fig. 7.** Amplitudes electrocorticográficas. A distribuição de amplitudes (A e B) e amplitudes médias (C) foram registados electrocorticograficamente em animais tratados com solução salina (SAL) ou açaí clarificado (AC) (10 mL/g por dia via gavagem, durante 4 dias) e depois tratou-se com pentilenotetrazol (60 mg/kg; PTZ e EO + PTZ, respectivamente). Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM (n=8). \*  $P < 0,001$  vs basal e grupos de açaí.

### 4.3.3 - O tratamento com AC de previne os efeitos deletérios do estresse oxidativo causados por convulsões no córtex cerebral

A administração de PTZ provocou um aumento significativo na peroxidação lipídica no córtex cerebral (Fig. 8), e este efeito foi completamente prevenido pelo tratamento com AC.

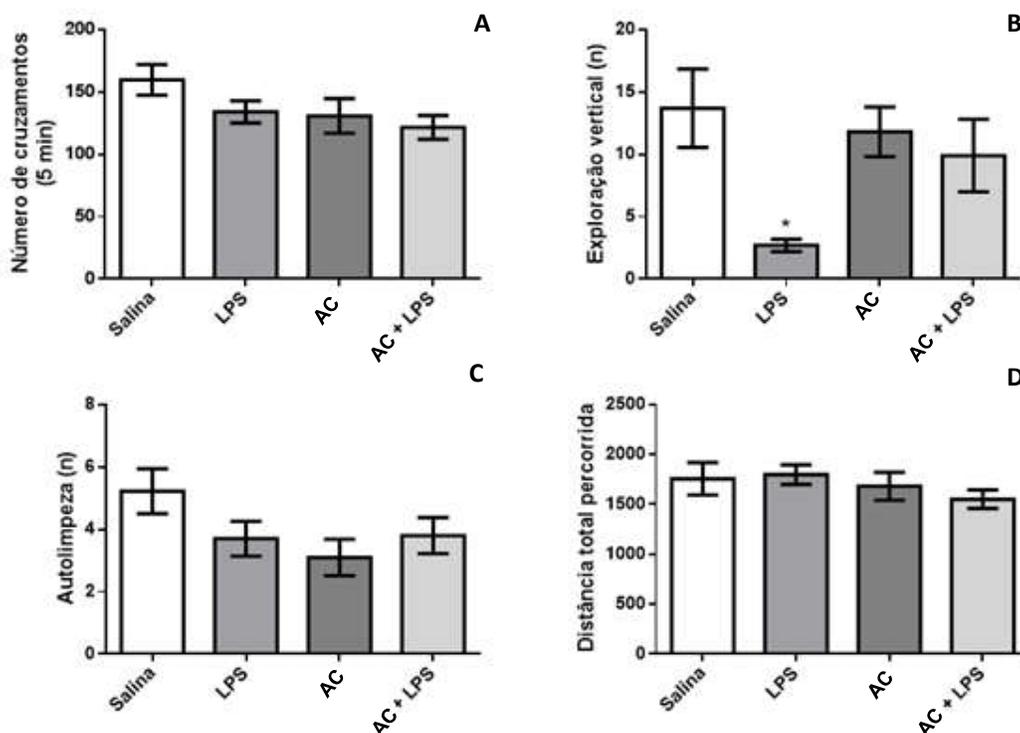


**Fig. 8.** Efeito do açaí clarificado (AC) sobre a peroxidação lipídica no córtex cerebral induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ). OE: via gavagem (10  $\mu$ l/g por dia) durante 4 dias. PTZ: 60 mg/kg i.p. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (n = 10). \*\*\* P <0,001 e \* P <0,05 vs. todos os grupos. MDA=malonaldeído.

## 4.4 - O tratamento com AC apresenta potente atividade antidepressiva

### 4.4.1 - O tratamento com AC não interfere na atividade locomotora espontânea no modelo de comportamento tipo depressivo

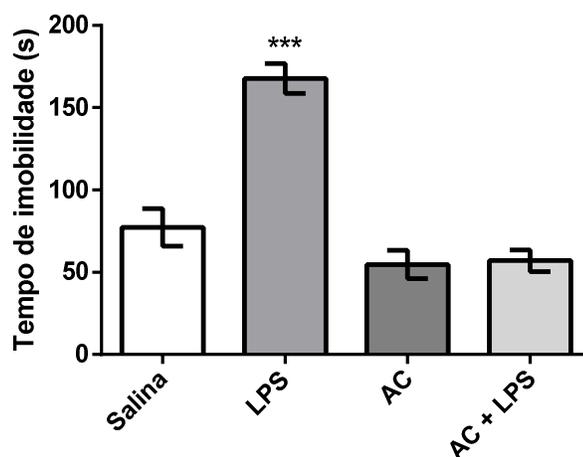
A atividade locomotora espontânea dos animais tratados com salina, AC e/ou LPS permaneceu inalterada (Fig. 9).



**Fig. 9.** Os tratamentos com açaí clarificado (AC) (10  $\mu$ l/g por dia - durante 4 dias, v.o.) e LPS (0.5 mg/kg, i.p.) não interferem na atividade locomotora espontânea dos animais. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão (n=10). \*  $P < 0,05$  vs Salina e EO.

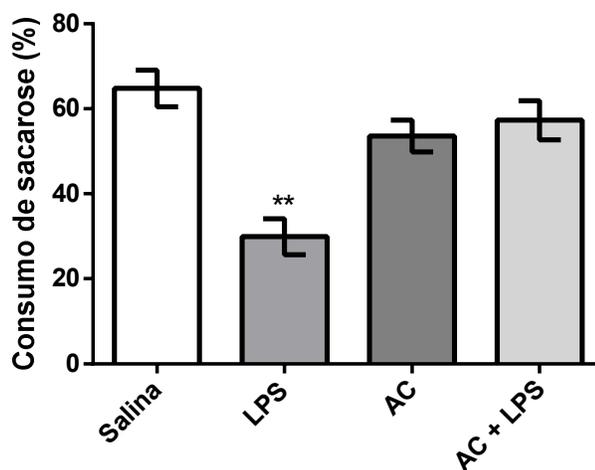
#### 4.4.2 - O AC previne as alterações comportamentais induzidas pelo LPS

Como esperado, a inoculação de LPS aumentou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando comparado aos animais controle, indicando o estabelecimento do comportamento tipo depressivo (Fig. 10). O tratamento com AC reduziu significativamente o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo de animais tratados apenas com LPS.



**Fig. 10.** Efeito dos tratamentos com açaí clarificado (AC) (10  $\mu$ l/g por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão (n=10). ### P<0,001 vs todos os grupos.

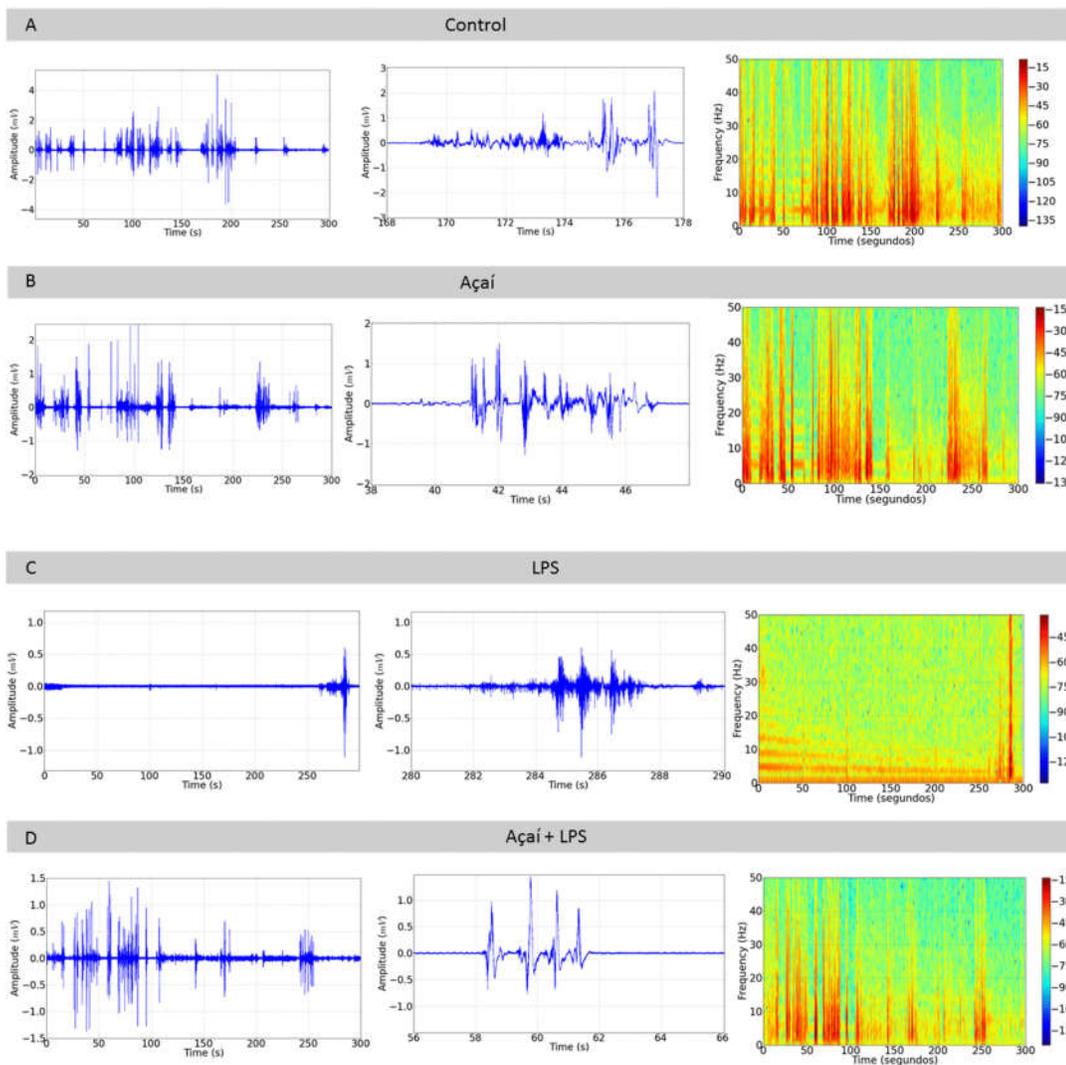
Vinte e quatro horas após a administração da endotoxina, os animais apresentaram significativa diminuição da preferência pela sacarose quando comparado aos animais controle (Fig. 11), caracterizando também o comportamento tipo depressivo. O tratamento com AC preveniu a redução do consumo de sacarose quando comparado aos animais tratados com LPS.



**Fig. 11.** Efeito do açaí clarificado (AC) (10  $\mu$ l/g por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre o consumo de sacarose no teste de preferência por sacarose. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão (n=13). \*\* P<0,001 vs. todos os grupos.

#### **4.4.3 - O tratamento com AC reduz de maneira significativa as alterações eletromiográficas causadas pelo comportamento tipo depressivo**

Os espectrogramas obtidos através dos registros eletromiográficos (Fig.12), demonstraram que a contração muscular dos animais do grupo controle (Fig. 12A) e AC (Fig. 12B) apresentaram nível de energia até 50 Hz, o que corresponde a atividade muscular normal. Já os animais tratados apenas com LPS apresentaram menor atividade muscular, caracterizando assim imobilidade (Fig. 12C). Os animais do grupo AC+LPS (Fig. 12D) demonstraram maior atividade muscular quando comparados aos animais que receberam apenas LPS, o que significa que o tratamento com AC preveniu a imobilidade do animal, o que resultou em uma atividade muscular semelhante à dos animais do grupo controle.



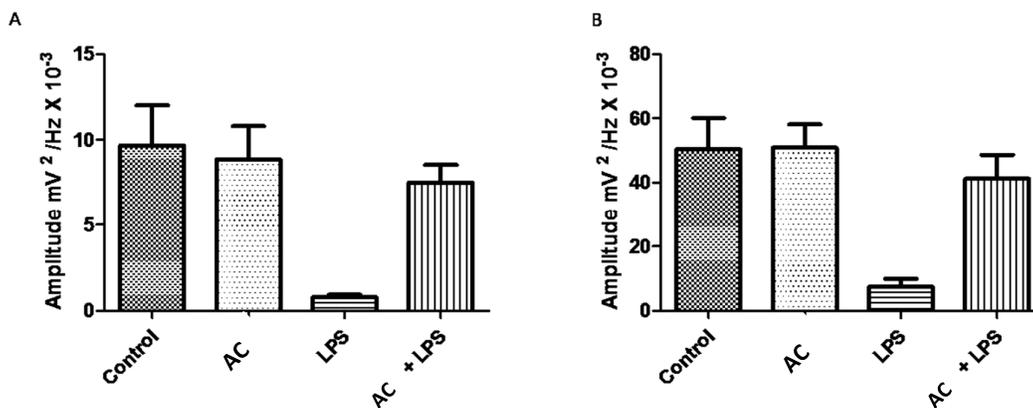
**Fig.12.** Registros eletromiográficos com suas respectivas distribuições de energia nas frequências até 50 Hz. (A) Eletromiograma controle, (B) Eletromiograma dos animais que utilizaram o açai, (C) eletromiograma dos animais que usaram o LPS, (D) eletromiograma dos animais que receberam aplicação de LPS e foram tratados com açai clarificado (AC) (n=5).

O gráfico de distribuição de frequência observado na figura 13A demonstra que durante o registro de 5 minutos não houve diferença estatística entre as médias de amplitude da atividade muscular entre os animais do grupo controle ( $9,683 \pm 5,181 \text{ mV}^2/\text{ Hz} \times 10^{-3}$ ) e açai ( $8,866 \pm 4,301 \text{ mV}^2/\text{ Hz} \times 10^{-3}$ ). A atividade muscular registrada pelos animais que receberam apenas LPS ( $0,787 \pm 0,3209 \text{ mV}^2/\text{ Hz} \times 10^{-3}$ ) foi significativamente menor quando comparada a atividade muscular dos animais do grupo AC+LPS ( $7,516 \pm 2,261 \text{ mV}^2/\text{ Hz} \times 10^{-3}$ ).

$10^{-3}$ ). Isso significa que o AC previne alterações de atividade muscular (imobilidade dos animais) induzidas pelo LPS.

Na figura 13B é demonstrado o nível de energia da maior contração muscular identificada durante o tempo de 5 minutos de registro, com distribuição de frequência até 50 Hz. A atividade muscular máxima registrada não foi diferente nos grupos controle ( $50,39 \pm 21,77 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) e AC ( $50,90 \pm 16,05 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ), porém a atividade muscular máxima nos animais do grupo LPS ( $7,460 \pm 5,514 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) foi muito menor quando comparado aos animais do grupo controle. Os animais do grupo AC+LPS ( $41,22 \pm 16,55 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) apresentaram atividade muscular máxima maior quando comparados aos animais do grupo LPS e semelhante aos animais do grupo controle. Esses dados demonstram que o AC previne o estabelecimento do comportamento tipo depressivo, uma vez que a imobilidade é um parâmetro comportamental característico desse modelo.

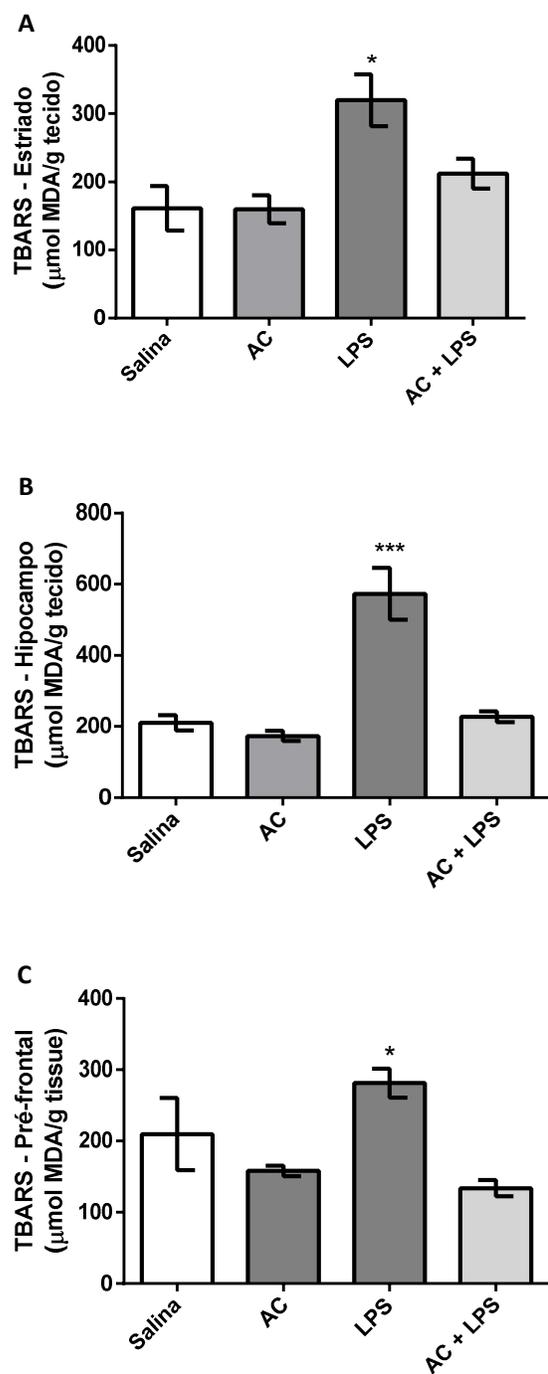
Nossos dados referentes ao teste de nado forçado e a eletromiografia comprovam que o AC previne a imobilidade dos animais, o que caracteriza a prevenção do comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS.



**Fig. 13.** Gráfico de distribuição de amplitude entre as frequências até 50 Hz em registros de 5 minutos da atividade muscular dos animais (A); Gráfico comparando as amplitudes da maior atividade muscular registrada durante o registro de 5 minutos com distribuição de frequência até 50 Hz (B).

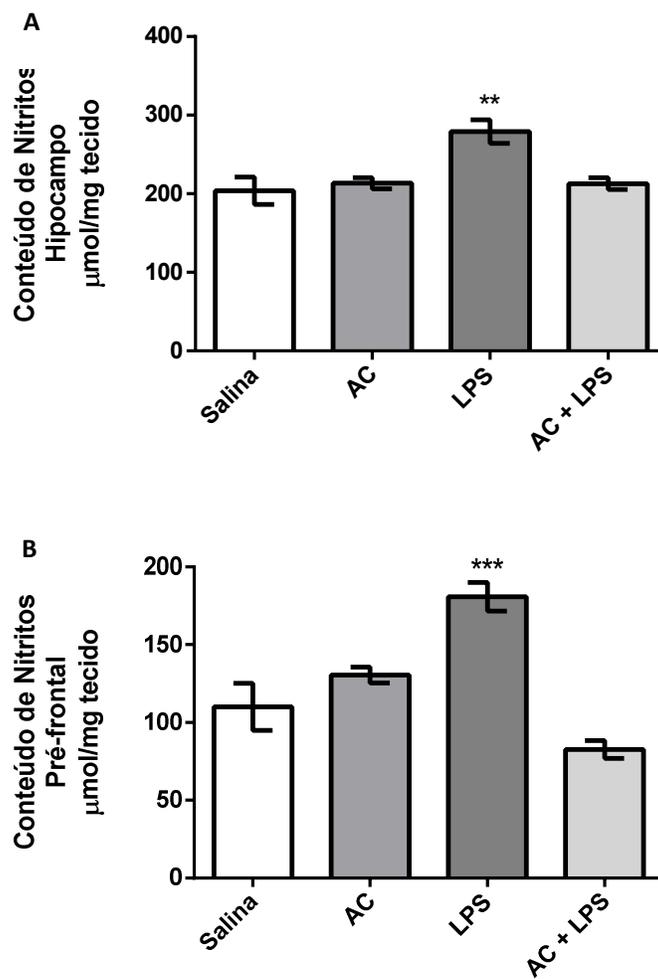
#### 4.4.4 - O AC previne o estresse oxidativo no cérebro dos animais tratados com LPS

Quando comparado ao grupo controle, o tratamento com LPS elevou significativamente os níveis de TBARS no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal (Fig. 14). O tratamento com AC preveniu a elevação de TBARS nestas áreas (Fig. 14A, B e C).



**Fig. 14.** Efeito do tratamento com açaí clarificado (AC) (10 μl/g por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre a peroxidação lipídica medida pelos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no corpo estriado (A), hipocampo (B) e córtex pré-frontal (C). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (n=10). Estriado - \* P<0,05 e \*\*\* P<0,001 vs todos os grupos.

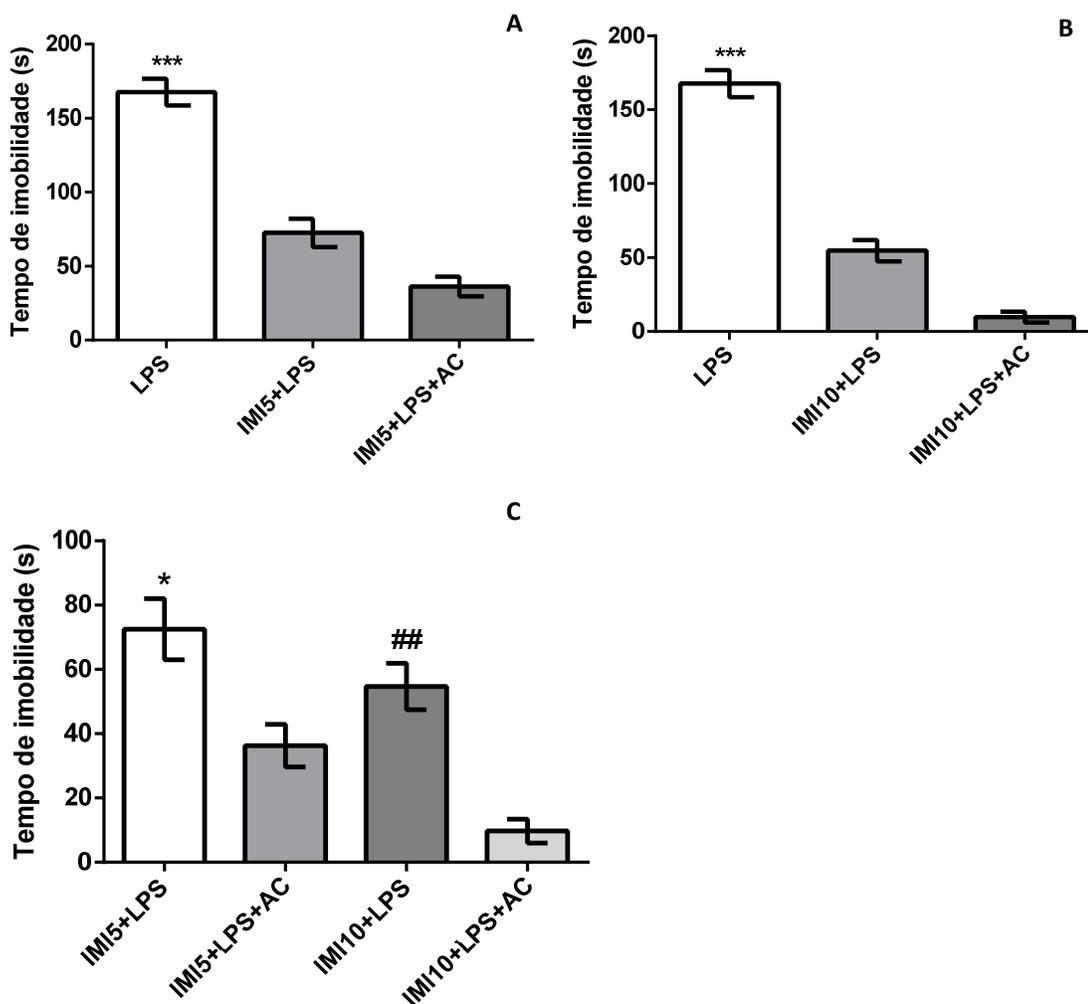
Os níveis de nitritos também foram mensurados como marcadores indiretos da produção de um dos principais radicais livres, o óxido nítrico (Fig. 15). Os elevados níveis de nitritos no córtex pré-frontal e no hipocampo foram reduzidos pelo tratamento com o AC (Fig. 15A e 15B).



**Fig. 15.** Efeito do tratamento com açai clarificado (AC) (10  $\mu\text{l/g}$  por dia durante 4 dias, v.o.) e/ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de nitritos no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B). Os dados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão (n=10). \*\* P < 0.01 e \*\*\* P < 0,001 vs. todos os grupos.

#### 4.4.5 - O tratamento com AC potencializa o efeito da imipramina na redução do comportamento tipo depressivo

Como esperado a imipramina, nas doses de 5 e 10 mg/kg, foi eficaz para o tratamento do comportamento tipo depressivo reduzindo significativamente o tempo de imobilidade provocado pelo LPS (Fig. 16, A e B). O tratamento com AC potencializou o efeito da imipramina na redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado (Fig. 16C).



**Fig. 16.** O tratamento com açaí clarificado (AC) (10  $\mu$ l/g por dia durante 4 dias, v.o.) potencializa o efeito imipramina nas doses de 5 e 10 mg/kg, no tempo de imobilidade no teste de nado forçado. \*\*\* $P < 0,001$  vs todos grupos, \* $P < 0,05$  vs IMI5+LPS+AC e ##  $P < 0,01$  vs IMI10+LPS+AC.

## 5 - DISCUSSÃO

O açaí é uma das frutas mais estudadas no mundo. Sua “popularidade” científica não está associada somente as suas propriedades nutricionais, mas principalmente a uma variedade de atividades biológicas. As propriedades biológicas mais pronunciadas do açaí descritas na literatura até agora são as atividades antioxidante e anti-inflamatória. Esses dois processos patológicos nos quais o açaí tem efeito protetor, o estresse oxidativo e a inflamação, são compartilhados por diversas patologias crônicas que acometem o sistema nervoso central. O estresse oxidativo e o processo inflamatório, como mecanismos patogênicos, contribuem para o início e progressão de doenças crônicas como: doença de Parkinson, doença de Alzheimer, epilepsia (crises convulsivas) e depressão. Essas doenças também partilham entre elas outras características, como o fato de serem crônicas, com altos índices de refratariedade ao arsenal farmacológico atualmente disponível e tratamentos de difícil acesso para populações isoladas como as que existem na Amazônia. Assim, por ser uma “superfruta” tipicamente Amazônica e com efeitos protetores sobre mecanismos comuns a patologias do sistema do sistema nervoso, o açaí possui o potencial de criar um grande impacto na terapia convencional de quadros clínicos como as crises convulsivas e os episódios depressivos.

### 5.1 - Atividade anticonvulsivante do açaí

Este trabalho demonstra, pela primeira vez, que o açaí clarificado exerce atividade protetora significativa contra convulsões e o estresse oxidativo relacionado as crises convulsivas.

Utilizamos o modelo experimental de crises convulsivas induzidas pelo PTZ, um bloqueador seletivo do canal de cloreto acoplado ao receptor GABA<sub>A</sub>. O PTZ é um importante modelo de convulsões mioclônicas e convulsões generalizadas tônico-clônicas e atualmente é considerado o modelo experimental padrão-ouro para a triagem de compostos com potencial atividade anticonvulsivante (Loscher, 2011; Pahuja *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2013; Yuen e Troconiz, 2015). Além disso, este modelo pode prever com mais precisão as consequências fisiológicas de convulsões em seres humanos e as suas respostas aos tratamentos, quando comparados com outros modelos de crises convulsivas (Yuen e Troconiz, 2015).

Em nosso modelo, foram usadas amostras de açaí clarificado (AC) destinadas ao consumo humano. Além disso, o AC foi escolhido porque o processo de clarificação reduz a quantidade de macronutrientes (lipídeos, fibras e proteínas), evitando a possível interferência

destes compostos nos resultados. Assim, o AC é constituído basicamente de compostos fenólicos, como as antocianinas, que representam os componentes bioativos mais abundantes do AC. A análise das amostras utilizadas no presente estudo revelou um conteúdo de 1662,15 mg equivalentes de ácido gálico/L de compostos fenólicos, incluindo 529 mg equivalentes de cianidina/L de antocianinas.

Apenas quatro doses de AC foram suficientes para aumentar de maneira significativa a latência das crises convulsivas e de reduzir fortemente a duração das convulsões mais graves (Fig. 5). Além dos dados comportamentais, os registros eletrocorticográficos mostraram que o PTZ induz alterações elétricas caracterizadas pelo aumento da amplitude de onda e que a ingestão prévia de AC impediu a elevação das amplitudes em aproximadamente 50% (Figs. 6 e 7).

Os registros elétricos, além da avaliação comportamental, têm sido uma ferramenta útil e objetiva para verificar alterações causadas por excitabilidade neuronal em pacientes com epilepsia e em modelos experimentais. Um trabalho recente demonstrou a sensibilidade desse método para detecção e caracterização das crises convulsivas no modelo PTZ (Niknazar *et al.*, 2013). Este método tem algumas vantagens, pois caracteriza-se por promover danos mínimos ao encéfalo e é sensível o suficiente para indicar mudanças na gravidade das crises (caracterizada pelo aumento da frequência e/ou amplitude das ondas) que não podem ser quantificadas unicamente com a observação do comportamento. Em nosso trabalho por meio do registro eletrocorticográfico foi possível observar que o AC impediu de forma parcial as alterações causadas pelo PTZ, diminuindo a frequência das descargas e a amplitude média de onda (Figs. 6 e 7).

Estes resultados são ainda mais notáveis quando se considera que os novos instrumentos terapêuticos são por muitas vezes propostos como co-adjuvantes à politerapia para melhorar o efeito de fármacos clássicos. Isso acontece porque dificilmente extratos de plantas ou produtos naturais apresentam potência terapêutica suficiente quando usados isoladamente. Porém este não foi o caso do AC, porque o tratamento com o fruto já mostrou um efeito anticonvulsivo potente.

Além disso, aproximadamente 30% dos pacientes com epilepsia são afetados por convulsões resistentes à farmacoterapia anticonvulsivante atual (OMS, 2016), o que justifica a necessidade para encontrar novas alternativas, especialmente aquelas que são mais acessíveis para populações isoladas e com dificuldade de acesso aos medicamentos convencionais.

A dose de AC utilizado neste estudo (10 µl/g de peso corporal, equivalente a cerca de 700 ml para uma pessoa de 70 kg) foi só ligeiramente superior ao consumo humano médio

diário em várias regiões Brasil. Por exemplo, na Região Norte, não é raro encontrar pessoas que consomem 1 L/dia de açaí. Ainda, a concentração total de compostos fenólicos e antocianinas é em grande parte representativa do que normalmente é encontrado no açaí consumido no dia-a-dia pela população.

Cabe destacar que não ocorreram alterações no peso corporal (dados não mostrados) ou na atividade locomotora espontânea (Fig. 4) nos animais tratados com AC. Além disso, o consumo de quantidades similares de açaí aparentemente não é tóxica para os seres humanos (Mertens-Talcott *et al.*, 2008), e tratamentos agudos e sub-crônicos com doses maiores de polpa de açaí não provocam efeitos genotóxicos em roedores (Ribeiro *et al.*, 2010). Portanto, nossos resultados sugerem que a suplementação da dieta com açaí poderia ter valor adicional em pacientes, proporcionando um efeito anticonvulsivante extra e provavelmente permitindo a utilização de doses mais baixas de drogas anticonvulsivantes clássicas, evitando-se numerosos efeitos secundários desses fármacos. Estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese sobre um possível efeito sinérgico.

O efeito anticonvulsivante do açaí é particularmente importante para regiões isoladas, como a Amazônia, onde a adesão ao tratamento farmacológico crônico, baseado no uso de anticonvulsivantes, é reduzida devido a fatores socioeconômicos (como a pobreza e o isolamento) que tornam difícil ter acesso aos serviços de saúde. Assim, uma palmeira como a *Euterpe oleracea* que é comum e amplamente distribuída na Amazônia (Bichara e Rogez, 2011) pode ser uma ferramenta extremamente útil no tratamento de convulsões, especialmente nessas populações.

Qual o mecanismo molecular subjacente ao potente efeito anticonvulsivante do açaí? Embora um estudo mais aprofundado seja necessário para responder completamente esta questão, a capacidade antioxidante do açaí parece ser a primeira explicação da ação anticonvulsivante, já que o AC possui alto teor de compostos fenólicos, tais como flavonas (Kang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2013; Bonomo Lde *et al.*, 2014). O método de captura de radical livre DPPH, um composto considerado padrão ouro nos ensaios de avaliação de propriedades antioxidantes, revelou que o efeito antioxidante do AC é pelo menos 10 vezes mais potente que o de uma solução de 1 mg/ml de ácido ascórbico (Fig. 3). Ainda no ensaio de DPPH o AC apresentou 91,4% de porcentagem de redução do radical livre DPPH. Assim, quando comparado ao Trolox (800 µM de Trolox reduz o DPPH em aproximadamente 81%, como descrito por Bonomo L *et al.* (2014), a diluição de 1:100 do AC demonstra maior capacidade antioxidante. Nossos resultados confirmam os resultados de

estudos anteriores que demonstram capacidade antioxidante excepcional do açaí (Kang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011; Gordon *et al.*, 2012; Bonomo Lde *et al.*, 2014).

Estudos recentes demonstram um importante papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da epilepsia e da refratariedade ao tratamento farmacológico da doença (Shin *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2012; Cardenas-Rodriguez *et al.*, 2013; Puttachary *et al.*, 2015). Além disso, modelos experimentais clássicos de convulsões (PTZ, estriçnina, e picrotoxina) e epilepsia (pilocarpina e ácido caínico) induzem convulsões através de diferentes mecanismos, mas compartilham uma via comum que é o estresse oxidativo (Loscher, 2011; Aguiar *et al.*, 2012).

O papel do estresse oxidativo sobre as crises convulsivas em humanos ainda não é totalmente elucidado e permanece controverso (Shin *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2012; Puttachary *et al.*, 2015). O cérebro é extremamente vulnerável ao dano oxidativo, porque apresenta uma fraca defesa antioxidante, elevado consumo de oxigênio e quantidade de compostos oxidáveis em comparação com outros órgãos (Shin *et al.*, 2011; Puttachary *et al.*, 2015). A peroxidação lipídica, uma das consequências mais prejudiciais do estresse oxidativo, é uma cascata de eventos bioquímicos que promovem a oxidação não específica dos ácidos graxos poli-insaturados, mediada por radicais livres. Um aumento significativo na peroxidação lipídica já foi demonstrado em pacientes com epilepsia e em modelos experimentais de convulsões e epilepsia (Shin *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2012; Puttachary *et al.*, 2015).

Em nosso trabalho, a administração de 60 mg/kg de PTZ aumentou significativamente a peroxidação lipídica no córtex cerebral (Fig. 8). Estes resultados estão de acordo com estudos recentes, que utilizam a mesma dose de PTZ e mostram um aumento de 44 e 98% na peroxidação lipídica em comparação ao grupo controle (Chowdhury *et al.*, 2013; Naziroglu *et al.*, 2013). Convulsões induzidas pelo PTZ exacerbam o estresse oxidativo através do aumento da produção de ROS e diminuiu a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase ou superóxido dismutase (Rodrigues *et al.*, 2012; Branco Cdos *et al.*, 2013; Chowdhury *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013).

Curiosamente, o AC foi capaz de prevenir completamente a peroxidação lipídica no córtex cerebral de animais que receberam PTZ (Fig. 8). Apesar do tratamento com AC não ter eliminado (prevenido) completamente as crises convulsivas, a prevenção da peroxidação lipídica no córtex cerebral, pode levar a uma redução significativa de convulsões subsequentes e de suas consequências deletérias, uma preocupação importante em pacientes com epilepsia.

Embora nossos resultados com o método de DPPH e peroxidação lipídica sinalizem que a potente atividade antioxidante do AC deve ser um dos mecanismos responsáveis por esta atividade protetora (Figs. 3 e 8), outros possíveis mecanismos moleculares de ação não podem ser descartados. Recentemente, o tratamento com açaí demonstrou modular a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, tais como *gsc-1* (a enzima limitante na síntese glutatona) e fatores de transcrição (especialmente aqueles regulados pela via de sinalização de insulina/IGF-1) que afeta a resistência ao estresse (Bonomo Lde *et al.*, 2014). A possível ocorrência destes mecanismos genéticos mais a aparente ausência de efeitos genotóxicos dos tratamentos sub-crônicos com açaí (Ribeiro *et al.*, 2010) podem ser um apoio adicional para a utilização do tratamento crônico com açaí em pacientes com epilepsia.

Quais componentes do açaí são responsáveis por provocar estes possíveis mecanismos de proteção? A relação entre atividade anticonvulsivante e antioxidante foi mostrada pela indução de efeitos anticonvulsivantes através das ações antioxidantes de extratos vegetais (Pahuja *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012; Naziroglu *et al.*, 2013; Naziroglu e Yurekli, 2013). Os efeitos anticonvulsivantes de plantas medicinais já foram explicados com base nas propriedades ansiolíticas ou sedativas, na influência sobre os receptores de (GABAA, glutamato, etc.), e na modulação de fatores neurotróficos (Zhu *et al.*, 2014). Embora sejam necessários estudos comportamentais adicionais, o tratamento com AC parece não ter efeitos sedativos importantes, uma vez que não foram detectadas diferenças no teste de campo aberto (Fig. 4).

O açaí usado em nosso trabalho é um produto aquoso caracterizado pela redução de sólidos insolúveis e lipídeos, mantendo uma elevada capacidade antioxidante devido à presença de compostos fenólicos, tais como antocianinas, flavonas, proantocianidinas, e outros flavonoides. Cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-glicosídeo, orientina, homoorientina e ataxifolina deoxyhexose são os principais flavonoides presentes no açaí (Dias *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013). É interessante que os estudos recentes têm demonstrado que a maior absorção de antocianinas ocorre no estômago apenas 30 minutos após o consumo (Fernandes *et al.*, 2014). A eficácia de flavonoides, tais como wogonina, fisetina, vitexina e rutina (um dos flavonóides mais comuns em plantas e frutos), já foi mostrada em modelos experimentais com PTZ (Zhu *et al.*, 2014).

Considerando o elevado consumo humano dessa fruta, aliado à sua potente atividade anticonvulsivante, esforços adicionais devem ser dedicados a analisar os compostos bioativos responsáveis por esses efeitos *in vivo*. Embora os estudos *in vitro* com açaí relatem os efeitos

antiproliferativo, anti-inflamatório e cardioprotetor do açaí (Kang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012), os estudos *in vivo* ainda são escassos.

## 5.2 - Atividade antidepressiva do açaí

Este estudo é o primeiro a demonstrar que o açaí é capaz de prevenir o comportamento tipo depressivo e de reduzir o estresse oxidativo induzidos pela administração periférica do LPS, reconhecido como um modelo animal de comportamento tipo depressivo.

Estudos em humanos e animais demonstram que a ativação do sistema imune e o estresse oxidativo estão intimamente envolvidos na patogenia da depressão (Maes *et al.*, 2009; Maes *et al.*, 2011; Eyre e Baune, 2012b). Mas qual a relevância desses mecanismos para o estudo da depressão? O conhecimento desses mecanismos (alternativos à hipótese monoaminérgica usada para o desenvolvimento dos fármacos atualmente disponíveis) criam possibilidades de estudar a depressão por ângulos diferentes dos convencionais e de descobrir novas alternativas terapêuticas por meio de bioensaios farmacológicos mais sensíveis (Dantzer *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013). Por isso utilizamos o modelo do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que é caracterizado por induzir mudanças comportamentais em roedores que mimetizam algumas características da depressão clínica em humanos (Dantzer *et al.*, 2008; Tomaz *et al.*, 2014). Por meio desse modelo é possível selecionar potenciais drogas antidepressivas com boa especificidade e sensibilidade (Dantzer *et al.*, 2011).

O mecanismo molecular envolvido na ocorrência do comportamento tipo depressivo induzido pela endotoxina ainda não está completamente elucidado, porém sabe-se que a elevação de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo no cérebro, 24 horas após o tratamento com o LPS, estão envolvidos no aparecimento desse comportamento (Dantzer *et al.*, 2008; Ohgi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

O modelo animal que escolhemos para nosso estudo contempla todos os critérios estabelecidos para a validade de um modelo animal, que é determinada por três diferentes critérios: validade aparente, de construto e preditiva. O modelo do comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS apresenta sintomatologia e manifestações da doença semelhantes ao que ocorre em humanos (validade aparente); o comportamento tipo depressivo induzido no animal é revertido ou prevenido por tratamentos que são efetivos na depressão clínica (validade preditiva); e finalmente esse modelo experimental compartilha mecanismos neurobiológicos da depressão (validade de constructo). Diante do apresentado nosso modelo é

considerado válido para se estudar comportamento depressivo, logo os resultados obtidos sugerem atividade protetora frente a depressão (Fries e Magalhães, 2010).

No presente trabalho, foi seguido um protocolo de pré-tratamento com doses repetidas de AC, seguindo a linha dos trabalhos anteriores onde as drogas testadas nesse modelo para avaliar atividade antidepressiva são ministradas antes do LPS (Li *et al.*, 2013; 2013; Mello *et al.*, 2013). Uma possível crítica que podemos fazer a esse desenho experimental é o fato do pré-tratamento se revelar eficaz devido realmente a um efeito unicamente antidepressivo ou simplesmente evitou a neuroinflamação impedindo o estabelecimento do comportamento depressivo. Embora anti-inflamatórios comuns como a dexametasona já demonstraram sua eficácia na eliminação dos sintomas depressivos nas 9 horas seguintes à administração do LPS (Plessers *et al.*, 2016), pouco se sabe sobre o que acontece 24h após a inoculação do LPS junto com um antidepressivo, momento no qual o modelo é realmente caracterizado como de comportamento tipo depressivo. Entretanto, a neuroinflamação está intimamente ligada à gênese e propagação do quadro clínico depressivo. Por isso, o fato de evitar o estabelecimento dos comportamentos da depressão (prevenindo o estresse oxidativo e/ou a inflamação) é considerado como efeito antidepressivo (ao impedir o estabelecimento da resposta inflamatória e conseqüentemente do estresse oxidativo isso impediria um paciente de desenvolver a depressão).

O comportamento tipo depressivo em roedores é avaliado através do tempo de imobilidade e pela preferência por substâncias doces que podem ser mensurados pelos testes de nado forçado e de preferência pela sacarose, métodos padrão-ouro para avaliar o fenótipo depressivo em roedores, especialmente o teste de preferência pela sacarose que determina déficits motivacionais característicos da depressão (Dantzer *et al.*, 2008; O'connor *et al.*, 2009).

Antes do desenvolvimento do comportamento semelhante a depressão, o animal tratado com LPS desenvolve o comportamento doentio (caracterizado pela diminuição da preferência por soluções doces e redução da exploração social). Este comportamento inicial está associado à elevação das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no cérebro dos animais, que ocorre entre 2 e 6 horas após a administração do LPS. É importante destacar que a dose de LPS que induz as alterações comportamentais características desse modelo não causa sepse. O comportamento tipo depressivo ocorre 24 horas após a administração do LPS, nesse estágio os animais apresentam atividade locomotora normal, porém desenvolvem comportamentos característicos da depressão clínica (Dantzer, 2008; Dantzer *et al.*, 2011).

As avaliações do tempo de imobilidade, mensurado pelo teste do nado forçado, anedonia, avaliada pelo consumo de sacarose, e da atividade locomotora (analisada pelo teste de campo aberto) dos animais foram realizados 24 horas após administração do LPS. A elevação do tempo de imobilidade e a redução do consumo de sacarose caracterizam o comportamento tipo depressivo (Dantzer *et al.*, 2008; O'connor *et al.*, 2009; Sulakhiya *et al.*, 2014; Tomaz *et al.*, 2014).

Após avaliação desses parâmetros comportamentais concluímos que os animais utilizados em nosso estudo desenvolveram o comportamento tipo depressivo, uma vez que nossos dados são semelhantes aos achados da literatura em relação ao desenvolvimento desse comportamento (Dantzer *et al.*, 2008; Mello *et al.*, 2013; Tomaz *et al.*, 2014).

O açaí é considerado uma “superfruta” em decorrência de sua elevada capacidade antioxidante e potente atividade anti-inflamatória. Seu uso nesse estudo está relacionado à sua ampla disponibilidade na região Amazônica, na região Norte e as suas propriedades farmacológicas, que fazem do açaí uma das frutas mais estudadas no mundo (Kang *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2015).

O tratamento de 4 dias com AC preveniu o aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado e a diminuição do consumo de sacarose (Fig. 10 e 11), ou seja, o tratamento com AC resultou em normalização das alterações comportamentais induzidas pelo LPS, o que demonstra a notável capacidade do AC em prevenir o desenvolvimento de comportamentos que caracterizam a depressão, nesse sentido é importante destacar que as alterações comportamentais desse modelo estão atreladas aos mecanismos patogênicos da depressão clínica (inflamação e estresse oxidativo) (Maes *et al.*, 2009; Eyre *et al.*, 2012), sendo assim é prudente considerar que o açaí esteja interferindo nesses mecanismos.

O mais interessante é que o efeito protetor do AC em relação ao comportamento tipo depressivo é semelhante ou até mesmo mais pronunciado quando comparado ao efeito apresentado por algumas drogas antidepressivas clássicas como fluoxetina ou imipramina, que se mostram capazes de prevenir o comportamento tipo depressivo ao reduzir o tempo de imobilidade e de aumentar o consumo de sacarose em animais tratados com LPS (Ji *et al.*, 2014; Tomaz *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016).

Produtos bioativos de algumas plantas medicinais são capazes de atenuar o comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS. Alguns dos compostos que exercem esse efeito são: o Honokiol proveniente da *Magnolia officinalis* (Sulakhiya *et al.*, 2014), o Curcumin maior componente ativo da *Curcuma longa* (Wang *et al.*, 2014) e o Perillaldehyde o maior componente do óleo essencial da *Perilla Frutescens* (Ji *et al.*, 2014).

Quimicamente, o açaí é constituído por uma grande diversidade de substâncias bioativas, porém os compostos químicos mais notáveis e conhecidos do açaí são as antocianinas e flavonoides, mas além deles existe uma quantidade considerável de compostos fenólicos e lignanas. Das aproximadamente 90 substâncias químicas descritas no açaí, os compostos fenólicos e as antocianinas são os compostos que mais frequentemente estão associados à elevada atividade biológica dessa fruta (Menezes *et al.*, 2008; Heinrich *et al.*, 2011; Gordon *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2015).

Considerando a grande eficácia do efeito antidepressivo do açaí, parece pouco provável que o efeito protetor detectado no nosso modelo experimental esteja relacionado unicamente a um composto isolado, sendo mais provável que seja a associação de vários produtos bioativos do açaí que contribuem para esse efeito.

Estudos recentes demonstram que alguns dos compostos presentes no açaí exercem atividade antidepressiva em modelos experimentais de depressão (Bahramsoltani *et al.*, 2015), entre eles os ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido clorogênico, ácido ferrúlico, resveratrol e ácido gálico) e os flavonoides (apigenina, luteolina, quercetina e rutina) (Nakazawa *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010; Ishisaka *et al.*, 2011; Dhingra e Chhillar, 2012; Girish *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 2012; Zeni *et al.*, 2012b; a; Chhillar e Dhingra, 2013; Rinwa e Kumar, 2013; Yu *et al.*, 2013; De La Pena *et al.*, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos a partir dos compostos isolados encontrados no açaí são semelhantes aos resultados de nosso estudo. Resumidamente, os ácidos fenólicos e flavonoides, testados isoladamente, reduzem o tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão de cauda e/ou aumentam o consumo de sacarose no teste de preferência pela sacarose em modelos experimentais de depressão (Nakazawa *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010; Ishisaka *et al.*, 2011; Dhingra e Chhillar, 2012; Girish *et al.*, 2012; Zeni *et al.*, 2012a; b; Chhillar e Dhingra, 2013; Rinwa e Kumar, 2013; Yu *et al.*, 2013; De La Pena *et al.*, 2014).

Curiosamente, as propriedades farmacológicas do açaí de maior notoriedade são a anti-inflamatória e antioxidante. A atividade antioxidante do açaí é exercida em grande parte pelas antocianinas, proantocianidinas, os flavonoides e as lignanas (Kang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011). Assim, o efeito antidepressivo do AC pode estar relacionado também a sua propriedade antioxidante. Em resposta a administração sistêmica do LPS, células do sistema imunológico produzem quantidades exageradas de citocinas pro-inflamatórias e radicais livres tanto a nível periférico quanto central. E são essas mudanças que contribuem para o

comportamento tipo depressivo (Dantzer *et al.*, 2008; Dantzer *et al.*, 2011; Tomaz *et al.*, 2014).

Nossos dados demonstram claramente que a administração sistêmica do LPS estimulou o aumento da peroxidação lipídica e de nitritos no estriado, hipocampo e no córtex pré-frontal (Fig. 14 e 15). Essas áreas cerebrais participam da regulação do humor, recompensa, modulação de respostas emocionais, memória de trabalho e resposta ao estresse. Alterações estruturais e funcionais dessas áreas contribuem para a lentificação psicomotora, alterações da memória de trabalho, de atenção e falta de hedonismo. É comum pacientes com depressão apresentarem alterações funcionais dessas áreas em comparação a pacientes saudáveis, o que sugere o envolvimento neurobiológico dessas áreas com a depressão (Maletic *et al.*, 2007; Admon *et al.*, 2015; Jin e Maren, 2015; Reinhart *et al.*, 2015).

Considerando que a origem do comportamento tipo depressivo tem relação com a resposta inflamatória e que esta resposta é acompanhada pela indução do estresse oxidativo, é plausível relacionar que um dos mecanismos envolvidos na geração do comportamento tipo depressivo é o estresse oxidativo, tanto que Maes *et al.*, (2009) criaram uma nova teoria para a origem da depressão chamada de “hipótese inflamatória e neurodegenerativa da depressão”, em afirmação a esta teoria muitas evidências indicam que o aumento das espécies reativas do oxigênio, nitrogênio e a diminuição das defesas antioxidantes estão implicadas na patogênese da depressão (Maes *et al.*, 2011; Palta *et al.*, 2014; Black *et al.*, 2015).

Particularmente, a peroxidação lipídica e elevados níveis de nitritos são fatores envolvidos na progressão da depressão (Maes *et al.*, 2009; Maes *et al.*, 2011). O ensaio de TBARS é uma técnica comumente utilizada para quantificar níveis de MDA. Os níveis de TBARS encontram-se comumente aumentados em pacientes com depressão quando comparados a voluntários saudáveis (Galecki *et al.*, 2007) e também em áreas cerebrais de animais tratados com LPS (Tomaz *et al.*, 2014).

Além de TBARS, nossos dados estão em concordância com estudos prévios que sugerem o papel proeminente do NO e da via nitrérgica na fisiopatologia da depressão e modulação das alterações comportamentais e neuroquímicas observadas no comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS (Dhir e Kulkarni, 2007; Tomaz *et al.*, 2014).

Os mecanismos que explicam com precisão a relação entre o estresse oxidativo e a depressão ainda não são totalmente elucidados, mas é provável que a redução das defesas antioxidantes e os subsequentes eventos: o dano a biomoléculas, a neurodegeneração e a redução da neurogênese, conhecidamente induzidas pelo estresse oxidativo (e que acontecem

na depressão e em modelos animais da depressão) estejam relacionadas a patogênese dessa patologia (Maes et al., 2011; Black et al., 2015).

Assim, nossos resultados apoiam a hipótese de que um dos mecanismos que o AC utilizaria para prevenir o comportamento tipo depressivo seria sua potente atividade antioxidante, a mesma propriedade do AC que contribui para sua atividade anticonvulsivante (Souza-Monteiro *et al.*, 2015).

Evidências apontam que alguns antidepressivos podem corrigir o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e as defesas antioxidantes, ou seja, são drogas que podem agir sobre o estresse oxidativo. Por exemplo, a imipramina, um antidepressivo tricíclico, exerce sua atividade antidepressiva não apenas através da modulação do sistema monoaminérgico, mas também por meio de sua atividade antioxidante (Mello *et al.*, 2013). Dessa forma, o estresse oxidativo representa um alvo terapêutico promissor para o tratamento da depressão.

Além de sua efetividade em atenuar comportamentos característicos da depressão, o AC também foi capaz de potencializar a atividade antidepressiva da imipramina, um antidepressivo comumente utilizado na clínica e efetivo no modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS (Tomaz *et al.*, 2014; Muller *et al.*, 2015). A imipramina é um antidepressivo tricíclico cujo principal mecanismo de ação descrito é o bloqueio de transportadores de monoaminas que eleva as concentrações de serotonina e noradrenalina na fenda sináptica. Assim, além da atividade antioxidante e considerando o efeito resultante dessa associação, a hipótese de que o açaí poderia ter alguma influência adicional sobre o sistema monoaminérgico não pode ser descartada.

Essa hipótese é reforçada pelos efeitos modulatórios que alguns compostos do açaí, como o ácido elágico, o ácido ferrúlico, o ácido gálico, a apigenina, a rutina e o resveratrol, são capazes de exercer sobre o sistema monoaminérgico (Girish *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2005; Zeni *et al.*, 2012a; Nakazawa *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2013; Dhingra e Chhillar, 2012). Os mecanismos pelos quais esses compostos exercem atividade antidepressiva variam desde redução da atividade da monoaminoxidase (MAO) até interação com receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos.

Um outro mecanismo relacionado à patogenia da depressão e que é provavelmente influenciado pelo açaí é a neuroinflamação (Miller *et al.*, 2009). Além de seu envolvimento na patogenia da doença, a inflamação também contribui para a refratariedade nesses pacientes (Maes *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009). A neuroinflamação ainda permite que o glutamato e que os metabólitos do triptofano alcancem níveis neurotóxicos, reduz a neuroplasticidade hipocampal (neurogênese, plasticidade sináptica e a potenciação de longa duração) e promove

estresse oxidativo (Miller *et al.*, 2009; Eyre e Baune, 2012b). Assim, ação protetora do açaí nesse modelo provavelmente é exercida, pelo menos em parte, devido à potente atividade anti-inflamatória do açaí, já conhecida na literatura (Kang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2015).

Esta atividade é demonstrada através da capacidade que o açaí tem de reduzir os níveis séricos e a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  em macrófagos residentes em modelo experimental de aterosclerose em camundongos (Xie *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012). Já no modelo de inflamação aguda no pulmão induzido por cigarro, foi observado que o açaí é capaz de reduzir a migração de macrófagos alveolares, neutrófilos, a atividade da mieloperoxidase e a expressão de TNF- $\alpha$  (Moura *et al.*, 2012).

Em cultura de macrófagos tratada com LPS o velutin, flavonoide proveniente do açaí, inibe a via MAPK, a ativação do NF- $\kappa$ B e a expressão da IL-6 e TNF- $\alpha$  (Xie *et al.*, 2012).

O açaí também impede a ativação de mastócitos mediada por IgE, inibe a expressão gênica de moléculas de adesão endotelial, diminui a expressão de iNOS e COX-2 e inibe a atividade da COX-1 e COX-2 (Schauss *et al.*, 2006; Horiguchi *et al.*, 2011; Noratto *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Poulouse *et al.*, 2012).

Estes estudos demonstram que o açaí pode reduzir a inflamação por diversas vias inflamatórias e o mais interessante é que estas vias são ativadas na depressão e também no modelo de comportamento tipo depressivo utilizado em nosso trabalho.

Em estudo recente a apigenina, um dos compostos bioativos do açaí, demonstrou efeito antidepressivo ao inibir citocinas pró-inflamatórias e a expressão de iNOS e COX-2 via modulação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS (Li *et al.*, 2015), ou seja, esses dados reforçam nossa hipótese de que a atividade protetora do açaí frente ao comportamento tipo depressivo relaciona-se também a sua potente atividade anti-inflamatória.

A atividade anti-inflamatória e antioxidante do açaí nos leva a formular uma outra hipótese que possa explicar o efeito antidepressivo do AC. Evidências recentes demonstram que a inflamação e o estresse oxidativo reduzem a neurogênese, através da redução dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Maes *et al.*, 2011; Maes *et al.*, 2009). Esta neurotrofina, está envolvida em eventos da neurogênese e encontra-se em baixos níveis no cérebro de pacientes com depressão e em modelos animais da doença, como é o caso do modelo de comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS (McNally *et al.*, 2008; Maes *et al.*, 2009; Eyre e Baune, 2012b; Tomaz *et al.*, 2014).

Ainda não existe nenhum estudo relacionando o açaí ou compostos do açaí a neurogênese, mas como o açaí é capaz de inibir eventos da via inflamatória quanto do estresse oxidativo, acreditamos na hipótese de que o AC exerce efeito protetor contra o comportamento tipo depressivo por meio da manutenção dos níveis normais de BDNF no cérebro, ou seja, a inibição da inflamação e do estresse oxidativo exerceria efeito preventivo contra a redução de BDNF. Estudos adicionais poderão contribuir no futuro para elucidar se essa hipótese é acertada.

Independentemente do mecanismo molecular exato, o possível sinergismo farmacológico entre os diversos compostos presentes no açaí é particularmente importante devido aos problemas relacionados com a terapia atualmente disponível para a depressão que variam desde reações adversas indesejadas até problemas com a eficácia. É evidente que esses problemas precisam ser amenizados ou até mesmo evitados para proporcionar aos pacientes uma melhor qualidade de vida, e por isso as pesquisas atuais estão buscando alternativas aos antidepressivos convencionais e os compostos de origem natural representam uma ampla área de pesquisa na busca por novas terapias antidepressivas (Bahramsoltani *et al.*, 2015).

Por exemplo, a imipramina apresenta efeitos adversos como: distúrbios do sono, agressividade, disfunção sexual, erupções na pele, perda de cabelo e cansaço. Esses eventos indesejáveis afetam definitivamente a qualidade de vida dos pacientes. Nossos dados sugerem que a administração do açaí como adjuvante poderia ajudar a reduzir a dose do fármaco, reduzindo assim a quantidade e gravidade desses efeitos colaterais adversos e mantendo a eficácia antidepressiva.

O tratamento da depressão é ainda um desafio, uma vez que a adesão ao tratamento é prejudicada pelos efeitos adversos dos antidepressivos disponíveis. O açaí pode ajudar de maneira significativa no estabelecimento de novas alternativas terapêuticas para a depressão, que atualmente conta com estatísticas pessimistas em relação ao tratamento. Aproximadamente 30-50% dos pacientes não respondem as drogas antidepressivas disponíveis e cerca de 70% dos pacientes não ficam completamente livres dos sintomas depressivos (Hodes *et al.*, 2015).

Todas essas dificuldades demonstram a necessidade de se estudar terapias alternativas as já estabelecidas e de se descobrir novas substâncias (incluindo compostos de origem natural) com a ação antidepressiva. Considerando que a maioria dos fármacos atuais baseiam o efeito terapêutico na hipótese monoaminérgica da depressão, a solução para a refratariedade pode passar por novos fármacos que possuam mecanismos de ação diferentes ou adicionais a esse. Assim, é importante que estes novos compostos atuem sobre mecanismos patogênicos

alternativos à alteração da neurotransmissão monoaminérgica, o principal alvo farmacológico para o tratamento da depressão atualmente (Miller *et al.*, 2009; Maes *et al.*, 2011; Black *et al.*, 2015). Fármacos ou compostos bioativos de plantas que exercem ação protetora contra a depressão possuem o grande potencial de fornecer vários mecanismos de ação representando uma inovação terapêutica real.

## CONCLUSÕES

No modelo de crises convulsivas, o AC exerce proteção frente as alterações eletrocorticográficas e comportamentais induzidas pelo PTZ, o que demonstra sua potente atividade anticonvulsivante. Acreditamos que a atividade protetora do AC frente as crises convulsivas está associada à potente atividade antioxidante do AC, uma vez que o AC preveniu a peroxidação lipídica no córtex cerebral.

No modelo de comportamento tipo depressivo, o AC reduziu alterações eletromiográficas e comportamentais características da depressão (imobilidade e anedonia), o que significa que o AC previne o estabelecimento do comportamento tipo depressivo. A atividade antidepressiva do AC está relacionada a sua propriedade antioxidante, uma vez que o AC protegeu áreas cerebrais relacionadas ao estabelecimento da depressão (hipocampo, estriado e córtex pré-frontal) contra o estresse oxidativo. O AC ainda se mostrou eficiente ao potencializar a atividade antidepressiva da imipramina, um fármaco clássico para o tratamento da depressão.

Os benefícios do consumo do açaí não se limitam apenas a questões nutricionais, nesse trabalho demonstramos pela primeira vez que o açaí possui propriedades anticonvulsivantes e antidepressivas em modelos animais, o que sugere que a ingestão da polpa de açaí ou do AC pode ser um fator de proteção adicional contra a epilepsia e a depressão em humanos.

## 6 – REFERÊNCIAS

ADMON, R. et al. Striatal Hypersensitivity During Stress in Remitted Individuals with Recurrent Depression. **Biol Psychiatry**, v. 78, n. 1, p. 67-76, Jul 1 2015.

AGUIAR, C. C. et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 795259, 2012.

AGUIAR, C. C. et al. Effects of agomelatine on oxidative stress in the brain of mice after chemically induced seizures. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 6, p. 825-35, Aug 2013.

ALPER, K. et al. Seizure incidence in psychopharmacological clinical trials: an analysis of Food and Drug Administration (FDA) summary basis of approval reports. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 4, p. 345-54, Aug 15 2007.

AUVIN, S. et al. Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 303-310, Oct 2010.

AUVIN, S. et al. Inflammation exacerbates seizure-induced injury in the immature brain. **Epilepsia**, v. 48, p. 27-34, 2007.

BADAWY, R. A.; HARVEY, A. S.; MACDONELL, R. A. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy - part 1. **J Clin Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 355-65, Mar 2009a.

\_\_\_\_\_. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy - part 2. **J Clin Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 485-500, Apr 2009b.

BAHRAMSOLTANI, R. et al. Phytochemical constituents as future antidepressants: a comprehensive review. **Rev Neurosci**, v. 26, n. 6, p. 699-719, 2015.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 1, p. 68-82, Jan 2010.

BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). In: YAHIA, E. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits Volume 2: Açai to citrus.**: Cambridge: Woodhead Publishing, v.2, 2011. cap. 1, ISBN 9781845697334

9780857093622.

BLACK, C. N. et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164-75, Jan 2015.

BONOMO LDE, F. et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e89933, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRANCO CDOS, S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Res Bull**, v. 92, p. 60-8, Mar 2013.

BUCKMASTER, P. S.; DUDEK, F. E. Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, n. 5, p. 2685-2696, May 1997.

CAPURON, L.; MILLER, A. H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacol Ther**, v. 130, n. 2, p. 226-38, May 2011.

CARDENAS-RODRIGUEZ, N. et al. Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 1, p. 1455-76, 2013.

CHHILLAR, R.; DHINGRA, D. Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, n. 4, p. 409-18, Aug 2013.

CHOWDHURY, B.; BHATTAMISRA, S. K.; DAS, M. C. Anti-convulsant action and amelioration of oxidative stress by Glycyrrhiza glabra root extract in pentylenetetrazole- induced seizure in albino rats. **Indian J Pharmacol**, v. 45, n. 1, p. 40-3, Jan-Feb 2013.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 46-56, Jan 2008.

DANTZER, R. et al. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 426-36, Apr 2011.

DE LA PENA, J. B. et al. Luteolin mediates the antidepressant-like effects of *Cirsium japonicum* in mice, possibly through modulation of the GABAA receptor. **Arch Pharm Res**, v. 37, n. 2, p. 263-9, Feb 2014.

DHINGRA, D.; CHHILLAR, R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 4, p. 796-807, 2012.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 4, p. 921-5, May 9 2007.

DIAS, A. L. et al. A rapid validated UHPLC-PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 907, p. 108-16, Oct 15 2012.

DIAS, A. L. et al. Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-anthocyanin flavonoids quantification in Euterpe oleracea juice. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, n. 28, p. 9235-49, Nov 2013.

DOWLATI, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446-57, Mar 1 2010.

DUDEK, F. E.; STALEY, K. J. The time course of acquired epilepsy: implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 3, p. 240-6, Jun 27 2011.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-21, 1990.

EYRE, H.; BAUNE, B. T. Neuroimmunological effects of physical exercise in depression. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 2, p. 251-66, Feb 2012a.

\_\_\_\_\_. Neuroplastic changes in depression: a role for the immune system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 9, p. 1397-416, Sep 2012b.

EYRE, H. A.; PAPPS, E.; BAUNE, B. T. Treating depression and depression-like behavior with physical activity: an immune perspective. **Front Psychiatry**, v. 4, p. 3, 2013.

FERNANDES, I. et al. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 54-66, 2014.

FILIBIAN, M. et al. In vivo imaging of glia activation using H-1-magnetic resonance spectroscopy to detect putative biomarkers of tissue epileptogenicity. **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 1907-1916, Nov 2012.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005.

FOLBERGROVA, J. Oxidative stress in immature brain following experimentally-induced seizures. **Physiol Res**, v. 62 Suppl 1, p. S39-48, Dec 12 2013.

FORSGREN, L.; NYSTROM, L. An incident case-referent study of epileptic seizures in adults. **Epilepsy Res**, v. 6, n. 1, p. 66-81, May-Jun 1990.

FRIES, G. R.; MAGALHÃES, P. V. D. S. A pesquisa básica na Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul. **Rev Psiquiatr Rio Gd Sul**, v. 32, n. 2, p. 2, 2010.

GAITATZIS, A.; TRIMBLE, M. R.; SANDER, J. W. The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurol Scand**, v. 110, n. 4, p. 207-20, Oct 2004.

GALECKI, P. et al. [Lipid peroxidation and copper-zinc superoxide dismutase activity in patients treated with fluoxetine during the first episode of depression]. **Psychiatr Pol**, v. 41, n. 5, p. 615-24, Sep-Oct 2007.

GHASEMI, M.; SCHACHTER, S. C. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 617-640, Dec 2011.

GILLIAM, F. G. et al. Depression in epilepsy: ignoring clinical expression of neuronal network dysfunction? **Epilepsia**, v. 45 Suppl 2, p. 28-33, 2004.

GIRISH, C. et al. Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 682, n. 1-3, p. 118-25, May 5 2012.

GORDON, A. et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of acai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. **Food Chem**, v. 133, n. 2, p. 256-63, Jul 15 2012.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982.

GULCIN, I. et al. In vitro antioxidant properties of morphine. **Pharmacol Res**, v. 49, n. 1, p. 59-66, Jan 2004.

HANNESTAD, J. et al. The neuroinflammation marker translocator protein is not elevated in individuals with mild-to-moderate depression: a [(1)(1)C]PBR28 PET study. **Brain Behav Immun**, v. 33, p. 131-8, Oct 2013.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)—A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 11, 2011.

HODES, G. E. et al. Neuroimmune mechanisms of depression. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 1386-93, Oct 2015.

HORIGUCHI, T. et al. Inhibitory effect of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp on IgE-mediated mast cell activation. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 10, p. 5595-601, May 25 2011.

ISHISAKA, M. et al. Luteolin Shows an Antidepressant-Like Effect via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 34, n. 9, p. 6, 2011.

JI, W. W. et al. Effects of perillaldehyde on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 116, p. 1-8, Jan 2014.

JIN, J.; MAREN, S. Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. **Front Syst Neurosci**, v. 9, p. 170, 2015.

KANG, J. et al. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 610–617, 2010.

KANG, J. et al. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chem**, v. 128, n. 1, p. 152-7, Sep 1 2011.

KANNER, A. M. The Behavioral Aspects of Epilepsy: An Overview of Controversial Issues. **Epilepsy Behav**, v. 2, n. 1, p. 8-12, Feb 2001.

\_\_\_\_\_. Is depression a risk factor of worse response to therapy in epilepsy? **Epilepsy Curr**, v. 11, n. 2, p. 50-1, Mar 2011.

\_\_\_\_\_. Can neurobiological pathogenic mechanisms of depression facilitate the development of seizure disorders? **Lancet Neurol**, v. 11, n. 12, p. 1093-102, Dec 2012.

\_\_\_\_\_. Is depression associated with an increased risk of treatment-resistant epilepsy? Research strategies to investigate this question. **Epilepsy Behav**, v. 38, p. 3-7, Sep 2014.

KIM, J. Y. et al. Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish. **Int J Mol Med**, v. 30, n. 3, p. 606-14, Sep 2012.

KUMAR, A.; LALITHA, S.; MISHRA, J. Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice. **Epilepsy Behav**, v. 29, n. 1, p. 103-11, Oct 2013.

LEE, S. Y. et al. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 224-35, Oct 1 2013.

LI, M.; SOCZYNSKA, J. K.; KENNEDY, S. H. Inflammatory biomarkers in depression: an opportunity for novel therapeutic interventions. **Curr Psychiatry Rep**, v. 13, n. 5, p. 316-20, Oct 2011.

LI, R. et al. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neurosci Lett**, v. 594, p. 17-22, May 6 2015.

LOPEZ, J. et al. Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. **Clin Biochem**, v. 40, n. 5-6, p. 292-8, Mar 2007.

LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-68, Jun 2011.

LOSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 4, p. 668-700, Dec 2010.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 587, n. 1-3, p. 163-8, Jun 10 2008.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-92, Apr 29 2011.

MAES, M. et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab Brain Dis**, v. 24, n. 1, p. 27-53, Mar 2009.

MALETIC, V. et al. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. **Int J Clin Pract**, v. 61, n. 12, p. 2030-40, Dec 2007.

MAROSO, M. et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. **Nature Medicine**, v. 16, n. 4, p. 413-U91, Apr 2010.

MATUTE, C. Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. **J Anat**, v. 219, n. 1, p. 53-64, Jul 2011.

MCNALLY, L.; BHAGWAGAR, Z.; HANNESTAD, J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. **CNS Spectr**, v. 13, n. 6, p. 501-10, Jun 2008.

MEHTA, A. et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur J Pharmacol**, v. 698, n. 1-3, p. 6-18, Jan 5 2013.

MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 10, p. 1521-9, Oct 2013.

MENEZES, E. M. D. S. et al. Efeito da alta pressão hidrostática na atividade de enzimas da polpa de açaí. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, p. 6, 2008.

MENON, B.; RAMALINGAM, K.; KUMAR, R. V. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 21, n. 10, p. 780-4, Dec 2012.

MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 17, p. 7796-802, Sep 10 2008.

MILITAO, G. C.; FERREIRA, P. M.; DE FREITAS, R. M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 56, n. 1, p. 16-20, Jan 2010.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-41, May 1 2009.

MONIF, M.; BURNSTOCK, G.; WILLIAMS, D. A. Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 11, p. 1753-6, Nov 2010.

MOURA, R. S. et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3-4, p. 262-9, Feb 15 2012.

MULLER, L. G. et al. Diene Valepotriates from Valeriana glechomifolia Prevent Lipopolysaccharide-Induced Sickness and Depressive-Like Behavior in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 145914, 2015.

MUSZYNSKA, B. et al. Natural products of relevance in the prevention and supportive treatment of depression. **Psychiatr Pol**, v. 49, n. 3, p. 435-453, 2015.

NAKAZAWA, T. et al. Antidepressant-like effects of apigenin and 2,4,5-trimethoxycinnamic acid from Perilla frutescens in the forced swimming test. **Biol Pharm Bull**, v. 26, n. 4, p. 474-80, Apr 2003.

NAZIROGLU, M. et al. Capparis ovata modulates brain oxidative toxicity and epileptic seizures in pentylentetrazol-induced epileptic rats. **Neurochem Res**, v. 38, n. 4, p. 780-8, Apr 2013.

NAZIROGLU, M.; YUREKLI, V. A. Effects of antiepileptic drugs on antioxidant and oxidant molecular pathways: focus on trace elements. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 5, p. 589-99, Jul 2013.

NEWTON, C. R.; GARCIA, H. H. Epilepsy in poor regions of the world. **Lancet**, v. 380, n. 9848, p. 1193-201, Sep 29 2012.

NIKNAZAR, M. et al. A unified approach for detection of induced epileptic seizures in rats using ECoG signals. **Epilepsy Behav**, v. 27, n. 2, p. 355-64, May 2013.

NORATTO, G. D. et al. Polyphenolics from acai ( Euterpe oleracea Mart.) and red muscadine grape (Vitis rotundifolia ) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 14, p. 7999-8012, Jul 27 2011.

NORONHA, A. L. et al. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 880-5, May 2007.

O'CONNOR, J. C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Mol Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511-22, May 2009.

OHGI, Y. et al. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 4, p. 853-9, Feb 2013.

OMS, 2016. Epilepsy. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>

OMS, 2016. Depression. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>

ONEILL, L. A. J.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: A crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 6, p. 252-258, Jun 1997.

PAHUJA, M.; MEHLA, J.; KUMAR GUPTA, Y. Anticonvulsant and antioxidative activity of hydroalcoholic extract of tuber of *Orchis mascula* in pentylenetetrazole and maximal electroshock induced seizures in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 142, n. 1, p. 23-7, Jun 26 2012.

PALTA, P. et al. Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. **Psychosom Med**, v. 76, n. 1, p. 12-9, Jan 2014.

PANDYA, C. D.; HOWELL, K. R.; PILLAI, A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 214-23, Oct 1 2013.

PARK, S. H. et al. Antidepressant-like Effect of Kaempferol and Quercitrin, Isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Exp Neurobiol**, v. 19, n. 1, p. 30-8, Jun 2010.

PINEDA, E. A. et al. Interleukin-1beta causes fluoxetine resistance in an animal model of epilepsy-associated depression. **Neurotherapeutics**, v. 9, n. 2, p. 477-85, Apr 2012.

PITKANEN, A. Therapeutic approaches to epileptogenesis-Hope on the horizon. **Epilepsia**, v. 51, p. 2-17, 2010.

PITKANEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 14, p. 16-25, Jan 2009.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 2, p. 173-86, Feb 2011.

POULOSE, S. M. et al. Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 4, p. 1084-93, Feb 1 2012.

PUTTACHARY, S. et al. Seizure-Induced Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 745613, 2015.

RAVIZZA, T.; BALOSSO, S.; VEZZANI, A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 3, p. 223-30, Jun 27 2011.

RAVIZZA, T. et al. Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1 beta production. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 3, p. 327-333, Sep 2008.

REINHART, V. et al. Evaluation of TrkB and BDNF transcripts in prefrontal cortex, hippocampus, and striatum from subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. **Neurobiol Dis**, v. 77, p. 220-7, May 2015.

RIAZI, K.; GALIC, M. A.; PITTMAN, Q. J. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. **Epilepsy Res**, v. 89, n. 1, p. 34-42, Mar 2010.

RIBEIRO, J. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutat Res**, v. 695, n. 1-2, p. 22-8, Jan 2010.

RINWA, P.; KUMAR, A. Quercetin suppress microglial neuroinflammatory response and induce antidepressant-like effect in olfactory bulbectomized rats. **Neuroscience**, v. 255, p. 86-98, 2013.

RODRIGUES, A. D. et al. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylenetetrazole. **Neurochem Int**, v. 60, n. 8, p. 799-805, Jun 2012.

SCHAUSS, A. G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 22, p. 8604-10, Nov 1 2006.

SHIN, E. J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochem Int**, v. 59, n. 2, p. 122-37, Aug 2011.

SHNEKER, B. F.; FOUNTAIN, N. B. Epilepsy. **Dis Mon**, v. 49, n. 7, p. 426-78, Jul 2003.

SILVA, M. C. et al. Evidence for protective effect of lipoic acid and desvenlafaxine on oxidative stress in a model depression in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Aug 8 2015.

SOUZA-MONTEIRO, J. R. et al. Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. **Neurochem Int**, v. 90, p. 20-7, Nov 2015.

SOUZA, M. A. et al. Antioxidant activity elicited by low dose of caffeine attenuates pentylenetetrazol-induced seizures and oxidative damage in rats. **Neurochem Int**, v. 62, n. 6, p. 821-30, May 2013.

SULAKHIYA, K. et al. Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 744, p. 124-31, Dec 5 2014.

TAO, G. et al. Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. **Bioorg Med Chem**, v. 13, n. 15, p. 4777-88, Aug 1 2005.

TOMAZ, V. S. et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-46, May 30 2014.

TYNAN, R. J. et al. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 3, p. 469-79, Mar 2012.

VEZZANI, A. et al. Epilepsy and brain inflammation. **Exp Neurol**, Oct 1 2011.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2011.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLELINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, Apr 13 2012.

VEZZANI, A.; RUEGG, S. General conclusions. **Epilepsia**, v. 52 Suppl 3, p. 52-3, May 2011.

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 88, n. 1, p. 23-45, Jan 2010.

WALLS, A. B. et al. The anticonvulsant action of the galanin receptor agonist NAX-5055 involves modulation of both excitatory- and inhibitory neurotransmission. **Epilepsy Res**, v. 121, p. 55-63, Mar 2016.

WANG, Z. et al. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Behav Brain Res**, v. 274, p. 282-90, Nov 1 2014.

XIE, C. et al. Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 327-33, Jun 2011.

XIE, C. et al. The acai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF-alpha and IL-6 production through inhibiting NF-kappaB activation and MAPK pathway. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 9, p. 1184-91, Sep 2012.

YAMAGUCHI, K. K. et al. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chem**, v. 179, p. 137-51, Jul 15 2015.

YI, L. T. et al. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. **Life Sci**, v. 82, n. 13-14, p. 741-51, Mar 26 2008.

YU, Y. et al. Antidepressant-like effect of trans-resveratrol in chronic stress model: behavioral and neurochemical evidences. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 3, p. 315-22, Mar 2013.

YUEN, E. S.; TROCONIZ, I. F. Can pentylenetetrazole and maximal electroshock rodent seizure models quantitatively predict antiepileptic efficacy in humans? **Seizure**, v. 24, p. 21-7, Jan 2015.

ZENI, A. L. et al. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system. **Eur J Pharmacol**, v. 679, n. 1-3, p. 68-74, Mar 15 2012a.

\_\_\_\_\_. Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 181-6, Dec 2012b.

ZHANG, F. et al. Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 18 Suppl 1, p. S213-7, Jan 2012.

ZHANG, X. Y.; YAO, J. K. Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 197-9, Oct 1 2013.

ZHEN, J. et al. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on pentylenetetrazole-induced kindling and associated cognitive impairment in rats. **Int J Mol Med**, v. 34, n. 2, p. 391-8, Aug 2014.

ZHU, H. L. et al. Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities. **Epilepsia**, v. 55, n. 1, p. 3-16, Jan 2014.

ZHU, L. et al. Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. **Physiol Behav**, v. 163, p. 184-92, Sep 1 2016.

ZHU, L. et al. Salidroside attenuates lipopolysaccharide (LPS) induced serum cytokines and depressive-like behavior in mice. **Neurosci Lett**, v. 606, p. 1-6, Oct 8 2015.

ZUNSZAIN, P. A. et al. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 722-9, Apr 29 2011.