

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA

Jéssica de Rosso Motta

**EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO DE ABACATE (*Persea
americana*) EM UM MODELO *IN VITRO* DE ESTRESSE INDUZIDO
POR CORTISOL**

Santa Maria, RS
Janeiro, 2020

Jéssica de Rosso Motta

**EFEITO NEUROPROTEOR DO ÓLEO DE ABACATE (*Persea americana*) EM UM MODELO *IN VITRO* DE ESTRESSE
INDUZIDO POR CORTISOL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia. Linha de pesquisa saúde, funcionalidade e qualidade de vida no envelhecimento, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do título de **mestra em Gerontologia**.

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Barbisan

Co-Orientadora: Prof. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS
2020

Motta, Jéssica de Rosso Efeito neuroprotetor do óleo de abacate (*Persea americana*) em um modelo in vitro de estresse induzido por cortisol. / Jéssica de Rosso Motta.- 2020. 81 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Barbisan

Coorientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Educação Física e Desportos, Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, RS, 2020

1. *Persea americana* 2. Estresse crônico 3. Elementos nutricionais 4. Óleo de abacate I. Barbisan, Fernanda II. Mânica da Cruz, Ivana Beatrice III. Título.

Jéssica de Rosso Motta

**EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO DE ABACATE
(*Persea americana*) EM UM MODELO *IN VITRO* DE ESTRESSE
INDUZIDO POR CORTISOL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia. Linha de pesquisa saúde, funcionalidade e qualidade de vida no envelhecimento, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do título de **mestra em Gerontologia**.

Aprovada em 20 de janeiro de 2020

**Fernanda Barbisan, Dr^a
(Presidente/ Orientadora)**

Verônica Farina Azzolin, Dr^a (UFSM)

Isabel Roggia, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, ser superior que protege e ilumina meu caminho.

Aos meus pais Vera Gorete de Rosso Motta e Itamar da Silva Motta, por todo apoio e incentivo de sempre sem os quais não teria chegado até aqui, por acordar de madrugada e me levar na rodoviária várias vezes por semana.

A minha orientadora, mãe científica, parceira e amiga, se fosse listar tudo que tenho a te agradecer não caberia em uma dissertação, mas vou tentar sintetizar, agradecendo primeiramente porque se estou me tornando mestre é graças a ti por ter me incentivado tanto, obrigada pela paciência, puxões de orelha quando precisei, por todos os ensinamentos pessoais e acadêmicos, por ser esta pessoa e profissional incrível da qual sempre me inspiro em seguir...obrigada, obrigada e obrigada.

A todos os colegas do laboratório biogenômica pelo auxílio durante as experimentos.

A minha colega e gerente Andréia Giuliane, por ter permitido me ausentar várias vezes do trabalho para que pudesse me tornar mestra em Gerontologia.

Ao meu namorado Filipe Martini Mônico pelo companheirismo e paciência nas várias vezes que precisei me ausentar em favor dos estudos.

A minha Co-orientadora pela oportunidade de estar no mestrado e ser essa profissional e ser humano ímpar.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia
Centro de Educação Física e Desportos
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO DE ABACATE (*Persea americana*) EM UM MODELO *IN VITRO* DE ESTRESSE INDUZIDO POR CORTISOL

AUTORA: Jéssica de Rosso Motta
ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Barbisan
CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Introdução: O envelhecimento traz consigo preocupações próprias da idade, sendo o declínio fisiológico, o aparecimento ou o agravamento de doenças, incluindo os transtornos psiquiátricos como a depressão, mudanças físicas e psicológicas relacionados ao avanço da idade. O estresse vem sendo descrito por muitos autores como um possível gatilho para o desenvolvimento de uma série de patologias psiquiátricas e metabólicas e o hormônio cortisol em altos níveis parece ser o elo entre o estresse e o desenvolvimento de disfunções, incluindo a degeneração e morte neuronal. Diante desse contexto e levando em consideração que a população idosa na maioria dos casos faz uso de grande quantidade de fármacos, justifica-se a busca de elementos nutricionais que possam contribuir para o combate ao estresse. Um elemento nutricional a ser considerado é o ômega 3, presente em uma concentração considerável no abacate (*Persea americana*), fruto amplamente distribuído e consumido em todas as regiões do Brasil. **Objetivo:** avaliar o efeito neuroprotetor do óleo de abacate (*Persea americana*) em um modelo *in vitro* de estresse induzido por cortisol. **Metodologia:** Células neuronais da linhagem SHSY-5Y foram tratadas com óleo de abacate, obtido comercialmente, nas concentrações de (2, 5, 10, 20 e 30 µg/mL) durante 24 horas de incubação. Também foi realizada um curva concentração- resposta com o cortisol, obtido comercialmente via Sigma Aldrich (0.1, 0.3, 1, 3, 10ng/mL). Uma vez determinadas as concentrações, foram realizados novos experimentos onde as células neurais foram expostas concomitantemente ao cortisol e ao óleo de abacate a fim de se mensurar os marcadores relacionados à estresse oxidativo, apoptose, níveis da proteína neurogenica BDNF e níveis de antioxidantes. **Resultados:** A exposição ao cortisol isoladamente diminuiu significativamente a viabilidade celular (exceto 0.1 ng/mL). Por outro lado, as células neurais expostas a diferentes concentrações de óleo de abacate mostraram viabilidade semelhante ao grupo controle. Foram definidas como doses de escolha para as próximas etapas 10µg/ mL de óleo de abacate e 1ng/mL de cortisol. Um aumento significativo dos níveis de enzimas antioxidantes foi observado em todos os tratamentos. Todos os marcadores oxidativos analisados, foram diminuídos quando a presença de óleo de abacate se fez de forma concomitante com o cortisol. Marcadores apoptóticos como as caspases 3 e 8 tiveram queda na presença do óleo de abacate, e houve aumento dos níveis de BDNF, quando comparados com os números do cortisol isoladamente. **Discussão:** Em geral, o tratamento concomitante com cortisol e óleo de abacate reverteu os danos causados pelo cortisol aos neurônios, indicando relevância da molécula testada como possível neuroprotetor frente ao estresse crônico o qual tem relação íntima com níveis elevados de cortisol. **Conclusão:** Nossos resultados mostraram importante ação neuroprotetora do óleo de abacate, revertendo as taxas de mortalidade induzidas e também diminuindo os eventos de estresse oxidativo e apoptose induzidos pela exposição ao cortisol.

Palavras-chave: *Persea americana*. Estresse crônico. Elementos nutricionais. Óleo de abacate.

ABSTRACT

Masters dissertation
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia
Centro de Educação Física e Desporto
Universidade Federal de Santa Maria

NEUROPROTECTOR EFFECT OF AVOCADO OIL (*PERSEA AMERICANA*) A IN VITRO MODEL OF CORTISOL-INDUCED STRESS

AUTHOR: Jéssica de Rosso Motta
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbisan
CO-ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Introduction: Aging brings with it concerns specific to age, with the physiological decline, the onset or worsening of diseases, including psychiatric disorders such as depression, physical and psychological changes related to advancing age. Stress has been described by many authors as a possible trigger for the development of a series of psychiatric and metabolic pathologies and the hormone cortisol at high levels seems to be the link between stress and the development of dysfunctions, including neuronal degeneration and death. Given this context and taking into account that the elderly population in most cases makes use of a large amount of drugs, the search for nutritional elements that can contribute to the fight against stress is justified. One nutritional element to be considered is omega 3, present in a considerable concentration in avocado (*Persea americana*), a fruit widely distributed and consumed in all regions of Brazil. **Objective:** to evaluate the neuroprotective effect of avocado oil (*Persea americana*) in an *in vitro* model of stress induced by cortisol. **Methodology:** SHSY-5Y neuronal cells were treated with avocado oil, obtained commercially, in the concentrations of (2, 5, 10, 20 and 30 µg / mL) during 24 hours of incubation. A concentration-response curve was also performed with cortisol, obtained commercially via Sigma Aldrich (0.1, 0.3, 1, 3, 10ng / mL). Once the concentrations were determined, new experiments were carried out where neural cells were simultaneously exposed to cortisol and avocado oil in order to measure markers related to oxidative stress, apoptosis, BDNF neurogenic protein levels and antioxidant levels. **Results:** Exposure to cortisol alone significantly reduced cell viability (except 0.1 ng / mL). On the other hand, neural cells exposed to different concentrations of avocado oil showed similar viability to the control group. 10µg / mL of avocado oil and 1ng / mL of cortisol were defined as the doses of choice for the next steps. A significant increase in the levels of antioxidant enzymes was observed in all treatments. All the oxidative markers analyzed, were reduced when the presence of avocado oil was made concomitantly with cortisol. Apoptotic markers such as caspases 3 and 8 had a decrease in the presence of avocado oil, and there was an increase in BDNF levels, when compared with the numbers of cortisol alone. **Discussion:** In general, concomitant treatment with cortisol and avocado oil reversed the damage caused by cortisol to neurons, indicating the relevance of the tested molecule as a possible neuroprotective in the face of chronic stress which is closely related to high levels of cortisol. **Conclusion:** Our results showed an important neuroprotective action of avocado oil, reversing the induced mortality rates and also decreasing the events of oxidative stress and apoptosis induced by exposure to cortisol.

Keywords: *Persea americana*. Stressechronic. Nutritional Elements. Avocado Oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Envelhecimento demográfico apresentado sob a forma de pirâmides etárias.....	18
Figura 2: Envelhecimento biológico celular.....	20
Figura 3: Cadeia transportadora de elétrons.....	21
Figura 4: Representação da diminuição do encurtamento telomérico a cada divisão celular.....	23
Figura 5: Relação entre o tamanho dos telômeros e a capacidade de proliferação celular.....	24
Figura 6: Visão geral do envelhecimento humano.....	26
Figura 7: Encurtamento telomérico, inflamação, estresse oxidativo e psicossocial.....	28
Figura 8: Esquema geral dos principais mecanismos causais associados ao estresse psicossocial.....	29
Figura 9: A inflamação e o estresse oxidativos são rotas que se retroalimentam.....	31
Figura 10: Abacate (<i>Persea americana</i>)- figura ilustrativa.....	33

LISTA DE FIGURAS MANUSCRITO

Figure 1: Viability comparison by MTT-assay by SHSY-5Y neural 24 h cultures.	44
Figure 2: Viability comparison by MTT-assay by SHSY-5Y neural 24 h cultures concomitantly exposed to different hydrocortisone (HC) concentrations and five avocado oil (AO) concentrations.	46
Figure 3: Comparison of oxidative markers and antioxidant enzymes (expression of proteins and genes) of SHSY-5Y neural crops exposed to hydrocortisone (HC, 1 ng / mL), avocado oil (AO, 5 µg / mL) and concent more exposed to the same individual concentrations.....	49
Figure 4: Comparison of apoptotic (protein and gene expression) markers of SHSY-5Y neural cultures exposed to hydrocortisone (HC, 1 ng / mL), avocado oil (AO, 5 µg / mL) and conhymentally hc more exposed individual concentrations.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compilação de dados sobre a composição nutricional, de ácidos graxos e compostos fenólicos presentes no abacate (<i>Persea americana</i>).....	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico
ADH: Vasopressina
AIDS: Do inglês, Acquired Immunodeficiency Syndrome (Tradução Síndrome imunodeficiência adquirida)
ANOVA: Análise de variância
AO: Óleo de abacete
BAX: Regulador pró apoptótico, pertencente a família BCL
BCL-2: Proteína, que atua como anti apoptótico
BDNF: Do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*
CASP-3: Caspase três
CASP 8: Caspase oito
CAT: Enzima catalase
CRH: Corticotrofina
C2C12: Linhas celulares de mioblastos de camundongo
DAMPS: Do inglês *Danger Patterns Molecules*
DCNTS: Doenças Crônicas não Transmissíveis
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DPM: Distúrbios psiquiátricos menores
EGCG: Epigallocatequina-galato
ER: Retículo endoplasmático
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
FADH: Flavina-adenina-dinucleotídeo
FAO: Do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
GPX: Enzima glutationa peroxidase
HPA: Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-2: Interleucina dois
IL-6: Interleucina seis
IL-10: Interleucina dez
INF- γ : Interferon gama
LPX: Lipoperoxidação
MIC: Microbioma-intestino-cérebro
MTT: Ensaio de redução de tetrazólio, avaliação da viabilidade celular
NADH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NBT: Reação com cloreto de nitrobluetetrazoliun
NF- $\kappa\beta$: Fator nuclear kappa Beta
ON: Óxido nítrico
O₂: Oxigênio singleto
O₂⁻: Radical superóxido
OH: Hidroxila
ONU: Organização das Nações Unidas
OxDNA: Oxidação do ácido desoxirribonucleico
8-OHdG: Quantificação da oito-hidroxi-dois'- desoxiguanosina
PCAR: Carbonilação de proteínas

PUFA-N3: Ácido graxo poli-insaturado ômega-três

PVN: Núcleo paraventricular hipotalâmico

SHSY-5Y: Linhagem celular

SNC:Sistema Nervoso Central

SOD2: Superoxido dismutase dois

TBARS: Do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*

TNF- α : Citocina pró-inflamatória interferon alfa

3T3-L1: Linhagem celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Objetivo geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Envelhecimento demográfico	18
2.2 Envelhecimento biológico/ celular	18
2.2.2 Senescência Celular	19
2.2.3 Encurtamento telomérico	22
2.3 Encurtamento telomérico, senescência, estresse oxidativo e inflamação: uma relação complexa	24
2.4 Envelhecimento, estresse e cortisol	26
2.5 Papel da dieta na prevenção de dcnts associadas ao envelhecimento	31
2.6 Matriz química do abacate	34
3 MATERIAIS E METODOS	38
3.1 Delineamento do estudo	38
3.2 Proveniência do óleo de abacate	39
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Manuscrito	41
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO A	81

1 INTRODUÇÃO

A população mundial tem envelhecido em ritmo acelerado. Especificamente no Brasil, na década de 50, cerca de 4% da população era considerada idosa e a longevidade média estava em torno de 50 anos. Já no censo de 2016, esse percentual mais que duplicou, chegando a 10,8%, com longevidade média de 75,7 anos (IBGE, 2016). No entanto, o fato de as pessoas estarem vivendo mais tempo, não significa necessariamente que elas estejam vivendo de forma mais saudável e com maior qualidade de vida (ONU, 2018), uma vez que o envelhecimento cronológico é considerado o maior preditor de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) (EPEL, 2009).

Sendo o envelhecimento parte inalterável da biologia dos seres humanos, é preciso buscar maneiras de estender à expectativa de vida saudável através da compreensão do envelhecimento biológico influenciadas pela interação de fatores genético-ambientais. A desaceleração desse processo passa pela adoção de atitudes que possam estender o tempo de vida livre de DCNTs (BELLAMY, 1995; CRUZ, 2015).

O envelhecimento biológico/celular pode ser explicado por diversas teorias, dentre elas pela teoria das espécies reativas de oxigênio (EROs). O oxigênio é uma molécula paradoxal, ao mesmo tempo que é fundamental para os organismos aeróbios na geração de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e em inúmeras vias metabólicas fundamentais, por outro lado, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas ao nível intracelular e extracelular, as EROs (HALLIWELL, 2007).

A ação das EROs é concentração dependente, sendo que em baixas concentrações contribuem para processos biológicos como sinalização celular, entretanto em concentrações mais elevadas as EROs podem causar estresse oxidativo, estado associado a danos a proteínas, lipídeos e DNA. Por causar prejuízo a estrutura e a função celular, o estresse oxidativo está associado a processos inflamatórios crônicos, que por sua vez, induzem maior produção de EROs e mais estresse oxidativo. Formando assim um ciclo que se retroalimenta e estando associado a aceleração do desenvolvimento de DCNTs, associadas ao processo de envelhecimento e morte celular (HALLIWELL, 2007; SINHA et al., 2013). Uma das principais respostas indiretas ao estresse crônico é o acúmulo de gordura visceral, que também pode promover um ambiente de inflamação sistêmica e estresse oxidativo.

Estudos demonstram que o ambiente bioquímico induzido pelo excesso de EROs e inflamação crônica parece ser ideal ao avanço de mecanismos de envelhecimento celular bem como nos processos patológicos relacionados ao estresse psicológico crônico. Sendo consistente a evidência acumulada de que indivíduos expostos ao estresse psicológico crônico, apresentam sinais de envelhecimento biológico acelerado, como inflamação sistêmica de baixo grau e menor comprimento dos telômeros (HUMPHREYS et al., 2012). O encurtamento dos telômeros, que são estruturas de DNA fita simples de sequência repetida que formam as extremidades dos cromossomos, é um dos principais marcadores de envelhecimento biológico. Tendo os telômeros a função de manutenção da estabilidade dos cromossomos, que contém a sequência de genes humanos, a diminuição destes, diminui também a proteção contra danos aos genes no momento da replicação, durante a mitose (EPEL et al., 2009).

O estresse psicológico têm sido associado a níveis mais elevados de estresse oxidativo e envelhecimento acelerado, o mecanismo ainda não está completamente claro, mas evidências indicam que hormônios relacionados ao estresse, como o cortisol possam ter forte envolvimento (GIDRON et al., 2006; EPEL et al., 2009; JORGENSEN et al., 2017).

Em indivíduos com baixa exposição ao estresse, o cortisol irá inibir a liberação de agentes pró-inflamatórios. Entretanto, em casos de estresse crônico o cortisol perde esta capacidade, através da inibição da expressão de genes dos receptores desse glicocorticoide e conseqüentemente não há mais resposta do organismo. Assim, pessoas cronicamente estressadas têm maior probabilidade de apresentar altos níveis sanguíneos de cortisol e desenvolver DCNTs (DELL-OSSO et al., 2011; ACABCHUK et al., 2017).

Sendo assim, se a exposição ao estresse desempenha um papel importante nos mecanismos até aqui apresentados, isso sugere que o controle do estresse deve ser um componente central das intervenções preventivas destinadas a potencializar o envelhecimento saudável e moléculas bioativas podem ser positivas no controle do cortisol (LEMGRUBER, 2013).

Além da questão direta da ação dos antioxidantes nas EROs, grande quantidade de evidências mostram uma comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central (SNC) e a microbiota gastrointestinal, num eixo reconhecido como microbioma-intestino-cérebro (MIC) (BERCIK et al., 2012, DU J, 2017).

Assim, alguns elementos nutricionais poderiam estar associados com proteção ao estresse psicossocial e transtornos psiquiátricos. Este é o caso do ácido graxo poli-insaturado ômega-3

(PUFA n-3), molécula que tem um papel crítico na estrutura e função cerebral. O PUFA n-3 constitui um dos principais fatores reguladores da neurotransmissão, neurogênese, sobrevivência celular e controle da neuroinflamação (FREEMAN et al, 2011).

Também é importante destacar que sua deficiência tem sido associada com vários distúrbios psiquiátricos, incluindo o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia, depressão maior e demência do tipo Alzheimer (CANHADA, 2015).

O PUFA n-3, tem ações antioxidantes e anti-inflamatórias, e geralmente, a suplementação é feita com óleo de peixe. Entretanto existem outros alimentos, inclusive vegetais que podem ter efeito na modulação do estresse psicossocial. Considerando a matriz nutricional, o abacate (*Persea americana*), tem muitas semelhanças com os óleos de peixe, as semelhanças na matriz refletem em estudos mostrando efeitos positivos também do abacate e seus subprodutos como o óleo (SMITH et al., 2009; ORTIZ-AVILA et al., 2015).

O abacate além dos antioxidantes de efeito direto frente as EROs, melhora a função mitocondrial impedindo o comprometimento da respiração mitocondrial e alterações no potencial da membrana mitocondrial, que por sua vez, quando conturbados geram mais EROs potencializando a consequente cascata de eventos já citados após a instauração do estresse oxidativo. Ameer, 2016, cita que os compostos do abacate são antioxidantes únicos, e que a diversidade de nutrientes bioativos presentes no abacate pode desempenhar um papel fundamental na prevenção e cura de várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson.

Assim, embora existam defesas inatas contra o estresse oxidativo limitando a ocorrência dos efeitos prejudiciais, sua capacidade de neutralizar a produção contínua e elevada (como a induzida pela exposição ao estresse crônico) de EROs se torna cada vez mais, ineficiente com o envelhecimento. Assim, relevantes intervenções voltadas à preservação do equilíbrio homeostático entre produção de EROs (oxidantes) e proteção antioxidante podem ser benéficas. Sendo assim, a principal hipótese aqui testada foi o possível efeito neuroprotetor do óleo de abacate (*Persea Americana*) em um modelo *in vitro* de estresse induzido por cortisol.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito neuroprotetor do óleo de abacate (*Persea americana*) em um modelo *in vitro* de estresse induzido por cortisol.

1.2.2 Objetivos Específicos

Células neuronais foram expostas ao cortisol e ao óleo de abacate (*Persea americana*) de forma isolada e concomitante, em um modelo *in vitro* de estresse onde buscou-se avaliar:

- Capacidade antioxidante do óleo de abacate;
- Marcadores de viabilidade e proliferação celular;
- Marcadores de estresse oxidativo e da apoptose;
- Níveis da molécula neurogênica BDNF.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Envelhecimento demográfico.

O mundo está envelhecendo, a longevidade atual mostra o Japão como país mais longevo do mundo com cerca de 82,7 anos de média a idade das pessoas ao morrerem. No Brasil, a longevidade também é uma realidade, sendo que em 2016 a média de vida do brasileiro era de 75,7 anos. (IBGE, 2016)

A evolução na expectativa de vida, também pode ser observada nas pirâmides etárias divulgadas pelo IBGE em 2017, a pirâmide que tem como base crianças e jovens até os 20 anos até a década de 80, no ano de 2017, já não se apresenta mais como uma pirâmide, isto porque as taxas de natalidade e fertilidade são cada vez menores e o tempo de vida cada vez maior, como mostra a figura 1. (IBGE, 2017)

Figura 1: Envelhecimento demográfico apresentado sob a forma de pirâmides etárias.



Fonte: a autora, a partir de dados fornecidos pelo IBGE, 2016 e 2017

2.2 Envelhecimento biológico/celular

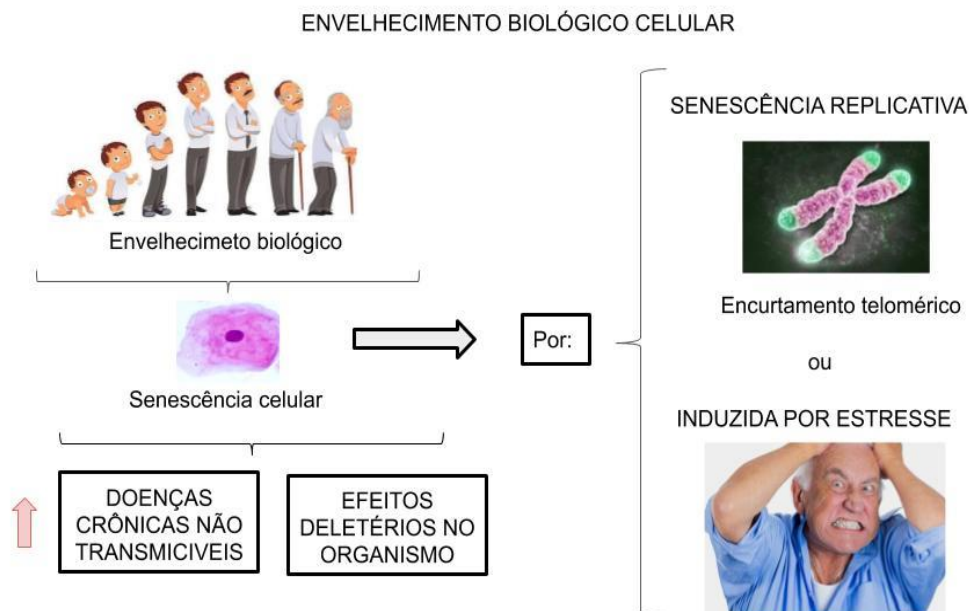
O envelhecimento biológico é um processo que tem início no nascimento, prosseguindo até a morte, com aceleração do processo pós período reprodutivo. Uma vez que a função biológica primordial de reprodução já deve ter sido cumprida. (TEIXEIRA, 2010).

2.2.2 Senescência Celular

O termo senescência apresenta um intervalo de mudanças relacionadas à passagem do tempo, causando efeitos deletérios no organismo. A senescência demonstra um fenótipo complexo da biologia que se manifesta em todos os tecidos e órgãos. Esse processo altera a fisiologia do organismo, exercendo um impacto na capacidade funcional do indivíduo ao torná-lo mais suscetível às doenças crônicas (HAYFLICK, 1961; TEIXEIRA, 2010).

Assim como mostra a figura 2, há dois tipos de senescência celular: (1) a senescência induzida por estresse, que ocorre em resposta aos eventos moleculares; (2) a senescência replicativa, que resulta do encurtamento dos telômeros. (MCCLINTOCK, 1984; TEIXEIRA, 2010).

Figura 2: Envelhecimento biológico-celular. O envelhecimento biológico predispõe a senescência celular e este fenômeno está associado a mais efeitos deletérios no organismo devido a diminuição dos sistemas de reparo de DNA, e a propensão ao maior desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Há 2 tipos de senescência celular, a senescência replicativa, via encurtamento telomérico ou a induzida por estresse, que ocorre em resposta aos eventos moleculares (TEIXEIRA, 2010).



Fonte: a autora

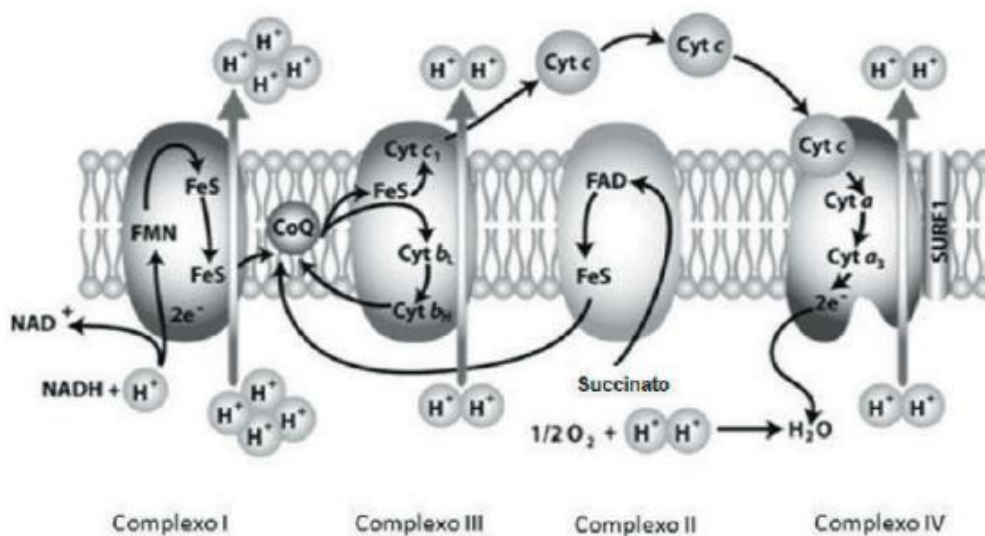
A teoria proposta em 1956 por Denham Harman, conhecida como teoria dos radicais livres, estabelece que o envelhecimento tem origem nos efeitos deletérios nas organelas celulares, causados pelas EROs (HARLEY, 1991; TEIXEIRA, 2010).

As EROs, são geradas fisiologicamente nos organismos aeróbios, sendo elas o oxigênio singlete (O_2), os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH). (HARLEY, 1991; TEIXEIRA, 2010). Esse processo ocorre em compartimentos dentro das células, a partir de proteínas localizadas internamente na membrana plasmática, no metabolismo lipídico no interior dos peroxissomos e na atividade enzimática do citosol como as ciclo-oxigenases. Entretanto, cerca de 90% das EROs são produzidas por mitocôndrias em decorrência da fosforilação oxidativa (GRIFFITH, 1999; TEIXEIRA, 2010).

A fosforilação oxidativa utiliza a oxidação controlada de FADH (flavina-adenina-dinucleotídeo) e de NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo), para a produção de energia potencial para fosforilar ADP, via F1-F0 ATPase, assim como mostra a figura 3. Os elétrons derivados do NADH ou FADH podem reagir diretamente com receptores de elétrons em vários

pontos da cadeia transportadora, ou com o oxigênio, gerando assim, as espécies reativas de oxigênio (DEPINHO, 2004).

Figura 3: Cadeia transportadora de elétrons. Representação esquemática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, Complexo I (NADH- ubiquinone oxidoreductase EC 1.6.5.3); Complexo II (Succinato- ubiquinone oxidoreductase EC 1.3.5.1); Complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase EC 1.10.2.2) e Complexo IV (citocromo c oxidoreductase EC 1.9.3.1).



Fonte: FERREIRA et al; OXPHOS: Déficit do Complexo I. Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déficit do Complexo I. Cadeia Respiratória Mitocondrial. ISSN 0871-3413 • Laboratório de Investigação, Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, INSA. ©ArquiMed, 2008

A ação das EROs pode ter efeitos cumulativos, causando alterações na morfologia, no número e na atividade enzimática das mitocôndrias, resultando em situações extremas, como a perda de eficiência funcional dessas organelas e na morte celular (DEPINHO, 2004).

Entretanto, há sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que buscam preservar a integridade celular neutralizando esses efeitos danosos. A defesa antioxidante endógena conta com constituintes não enzimáticos como a melatonina, glutathiona e ubiquinona. E com o sistema enzimático que é considerado a principal defesa antioxidante do organismo, composto pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPX). Os sistemas endógenos podem ser potencializados pelo sistema exógeno, que corresponde ao consumo de moléculas bioativas de vegetais em geral que além de terem sua ação antioxidante direta na

neutralização das EROs, ainda contribuem para a atividade antioxidante dos sistemas endógenos (DEPINHO, 2004).

2.2.3 Encurtamento Telomérico

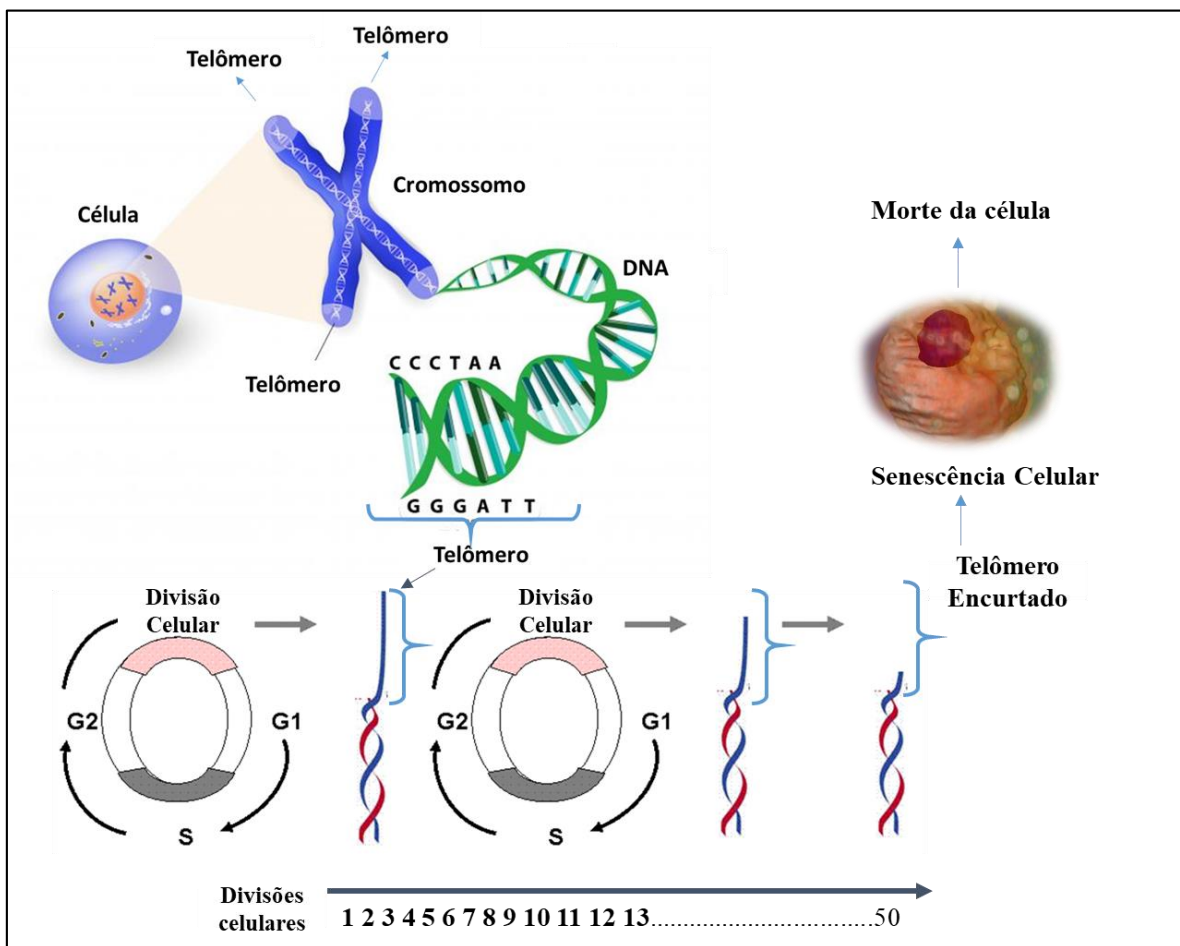
Um fator que merece destaque no processo de envelhecimento e que pode ser fortemente influenciado pela exposição ao estresse é o encurtamento telomérico. Em 1961, Leonard Hayflick e Paul Moorhead descobriram que as células humanas só podem dividir um cultura celular por até cerca de 50 vezes. Desde então, a capacidade proliferativa limitada de células humanas, conhecida como senescência replicativa, tornou-se um dos principais focos de pesquisa em biogerontologia. (HAYFLICK, 1961).

Os telômeros são seqüências repetitivas de TTAGGG localizadas no final dos cromossomos, cuja a principal função é limitar as extremidades do cromossomo protegendo-os contra uma eventual fusão ou degradação prematura da molécula de DNA, agindo ainda na regulação da síntese de DNA telomérico e regulação/manutenção do comprimento do telômero (CARC, 2015).

Os telômeros são uma espécie de pré-requisito para manutenção da estabilidade cromossômica. Para cumprir a função de “capas protetoras”, os telômeros precisam tem um comprimento mínimo, a ligação das proteínas estruturais aos telômeros funciona como “um grampo” para manutenção da estabilidade da estrutura e cobertura dos telômeros (CARC, 2015).

Entretanto, a cada divisão celular há um encurtamento dos telômeros, como mostra a figura 4 abaixo:

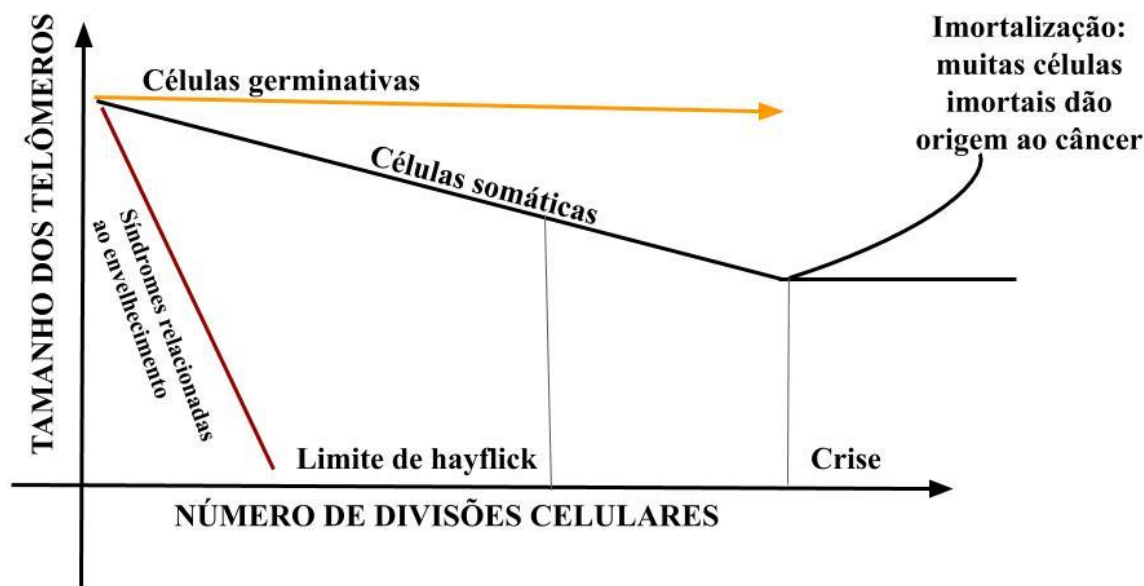
Figura 4: Representação da diminuição do encurtamento telômerico a cada divisão celular, culminando com a senescência celular.



Fonte: Figura criada pela autora a partir de imagens encontrada e adaptadas de do Google imagens.

O encurtamento dos telômeros ocorre devido ao mecanismo de replicação final da DNA-polimerase. O DNA contido nos cromossomos é replicado pela DNA polimerase, que não replica as extremidades finais, ou seja, os telômeros. A enzima que replica essas porções finais dos cromossomos, é a telomerase, que utiliza um RNA como molde para sintetizar uma fita de DNA. Entretanto, ondas de metilação que ocorrem no período gestacional, fazem com que a telomerase pare de funcionar na maioria das células humanas. As células que mantêm a telomerase ativa são os gametas, as células-tronco, os leucócitos ativos e as células tumorais (devido a mutações que as originaram. (TEIXEIRA, 2010) A figura 5, mostra a relação entre o tamanho dos telômeros e a capacidade de proliferação celular.

Figura 5: Relação entre o tamanho dos telômeros e a capacidade de proliferação celular. As células germinativas não-diferenciadas (linha amarela) possuem longos telômeros e se multiplicam indefinidamente, enquanto as células somáticas diferenciadas (linha preta) dividem-se por um número determinado de gerações e perdem gradualmente seus telômeros. No entanto, as células em crise, que já acumularam diferentes mutações, morrem ou reativam a telomerase, tornando-se imortais. Nas síndromes relacionadas ao envelhecimento prematuro, é observado o encurtamento acelerado dos telômeros (linha vermelha).



Fonte: Adaptado de Teixeira, 2010

2.3 Encurtamento telômerico, senescência, estresse oxidativo e inflamação: uma relação complexa

O estresse oxidativo e a inflamação estão envolvidos como mecanismos aceleradores do encurtamento telômerico, sendo considerados mecanismos pré-doença para doenças crônicas do envelhecimento, como por exemplo doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e transtornos mentais (ZHANG, et al; 2016).

Evidências da Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição conduzida por Needham e colaboradores (2015), citam que fatores como estresse oxidativo e inflamação vem sendo relacionados ao encurtamento acelerado dos telômeros. Na revisão os autores examinaram estudos que associaram depressão, ansiedade e duração dos telômeros. Estudos do Netherlands Study Of Depression and Anxiety, Verhoeven e colaboradores (2013) relataram que indivíduos com história de depressão maior tinham telômeros mais curtos em relação aos controles e que a

gravidade e duração da depressão foram inversamente associadas com o comprimento dos telômeros (VERHOEVEN et al; 2013) Outro estudo examinado usou dados do West of Scotland Twenty-07 Study, em que Phillips e colaboradores (2013) relataram que os sintomas depressivos estavam inversamente associados ao comprimento dos telômeros.

Min e Min (2017), levando em consideração que o estresse oxidativo pode acelerar o encurtamento dos telômeros e que os antioxidantes podem retardar seu encurtamento, analisaram 3660 participantes com 20 anos ou mais, via Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição de 1999-2002 com o objetivo de investigar a associação entre os níveis de carotenóides no sangue e o comprimento dos telômeros de leucócitos em uma amostra de adultos norte-americanos. Os resultados desse estudo demonstraram que níveis crescentes de carotenóides no sangue estavam significativamente associados a telômeros leucocitários mais longos em adultos norte-americanos. A alta ingestão de alimentos ricos em carotenóides pode desempenhar um papel na proteção dos telômeros e na regulação do comprimento dos telômeros.

À nível celular, o envelhecimento se traduz no encurtamento dos telômeros e juntamente com a inflamação demonstram uma associação bidirecional, tendo um estado pró-inflamatório contribuindo para o envelhecimento e disfunção dos telômeros e por sua vez, o desgaste dos telômeros sendo capaz de induzir uma inflamação de baixo nível (ZHANG et al; 2016).

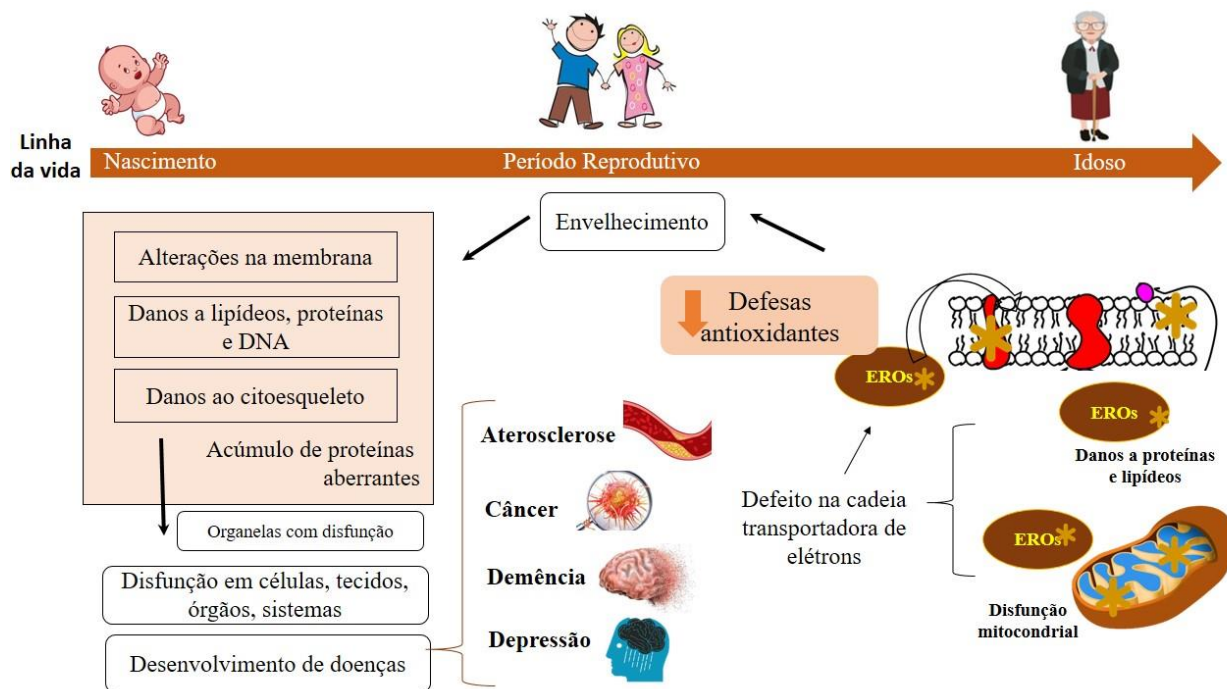
Estudos independentes mostraram menor comprimento dos telômeros e aumento dos níveis de citocinas inflamatórias circulantes em pacientes com transtorno de humor, sugerindo uma complexa interação entre as respostas imunológicas inflamatórias alteradas e a dinâmica dos telômeros na etiopatogênese desses distúrbios (WALKER, 2015 ; LAWRENCE, 2010).

Por outro lado, a investigação sobre a real capacidade de interação entre os processos inflamatórios e o encurtamento de telômeros na etiologia e progressão dos transtornos de humor tem sido bastante limitada. Apesar da hipótese do envolvimento de uma “rede telômero-inflamatória” nos transtornos do humor seja apoiada por dados, resultantes de investigações independentes, ainda é uma questão importante que precisa ser melhor compreendida (SQUASSINA, 2019).

De acordo com a revisão de Squassina (2019), os estudos publicados que implementam um delineamento longitudinal sugerem que a inflamação e o encurtamento telomérico influenciam-se mutuamente de maneira bidirecional, modulando os sintomas do humor e a susceptibilidade dos

indivíduos a transtornos do humor e comorbidades clínicas associadas ao envelhecimento. A figura 6, demonstra a visão geral do envelhecimento humano.

Figura 6: Visão geral do envelhecimento humano. O envelhecimento biológico é acelerado após o período reprodutivo. O envelhecimento é influenciado pelo equilíbrio entre os antioxidantes e EROs, o desequilíbrio em favor das EROs, causa danos em lipídeos, proteínas, além de disfunção mitocondrial e defeitos na cadeia transportadora de elétrons perpetuando o estresse oxidativo. Este último, por sua vez causa alterações nos componentes celulares, gerando disfunções nas células, tecidos, órgãos, sistemas, o que por sua vez pode causar o desenvolvimento de doenças comuns no envelhecimento.



Fonte: A autora.

2.4 Envelhecimento, estresse e cortisol

É fato que o aumento do tempo de vida é uma importante conquista da humanidade. Entretanto, o envelhecimento biológico relacionado com a sobrevivência até idades mais tardias pode ser, por si mesmo uma experiência estressante em decorrências das múltiplas perdas que o indivíduo que envelhece vivencia. Entre estas estão as perdas financeiras, psicossociais e pessoais, declínio na saúde, independência e das habilidades cognitivas e funcionais (BLESSMANN, 2004).

Especialmente no Brasil, onde existe uma valorização excessiva da aparência, a imagem corporal da velhice representada pelo declínio físico é visível e a dificuldade em aceitar este fato

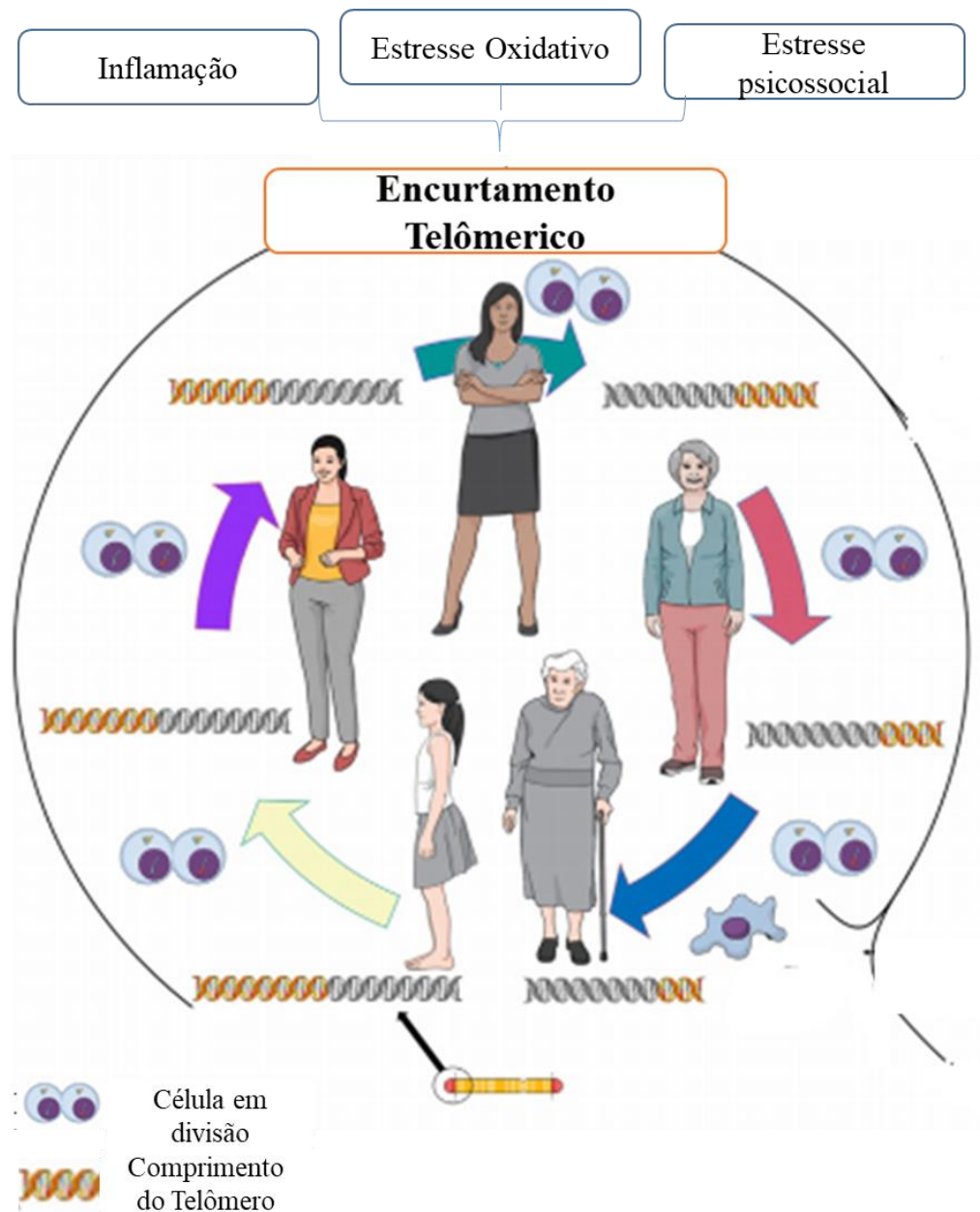
induz à existência de um eu visível, que envelhece, e um eu invisível, que se mantém jovem, gerando muitas vezes estresse (BLESSMANN, 2004).

Como já comentado, a velhice se constitui em um período de conflitos e mudanças tanto no aspecto fisiológico quanto no social (SU et al; 1997; FREITAS et al; 2004; PEREIRA et al; 2004). Em respeito a isto, Freitas e colaboradores (2004) comentam que: “Na sociedade de consumo em que vivemos, onde o valor social prioritário é o poder econômico, o idoso é discriminado e excluído por não ser mais produtivo, nem se integrar aos padrões de beleza e juventude culturalmente valorizados”.

Assim, além dos fatores de risco a DCNTs associados ao estilo de vida, como o sedentarismo e a superalimentação, nas últimas décadas, o papel do estresse crônico de origem psicossocial tem emergido como um potencial fator de risco para o desenvolvimento de DCNTs. Estudos epidemiológicos e experimentais descreveram que o estresse crônico é um fator que predispõe para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (MACHADO et al., 2014), de osteoporose (AZUMA et al., 2015), doenças cardiovasculares (STEPTOE E KIVIMÄKI, 2012; MA et al; 2017; KIVIMÄKI et al; 2018) e alguns tipos de câncer (PAYNE et al; 2015) incluindo câncer de mama (CHIRIAC et al., 2018).

O estresse crônico de origem psicossocial também parece aumentar o risco de doenças metabólicas incluindo a diabetes mellitus tipo 2 e a hipercolesterolemia (WU et al., 2018). O risco de desenvolvimento de doenças autoimunes também parece ser aumentado por situações de estresse crônico de origem psicossocial (STOJANOVICH, 2010), incluindo esclerose múltipla (SONG et al; 2018), assim como mostra a figura 7.

Figura 7: Encurtamento telomérico, inflamação, estresse oxidativo e psicossocial

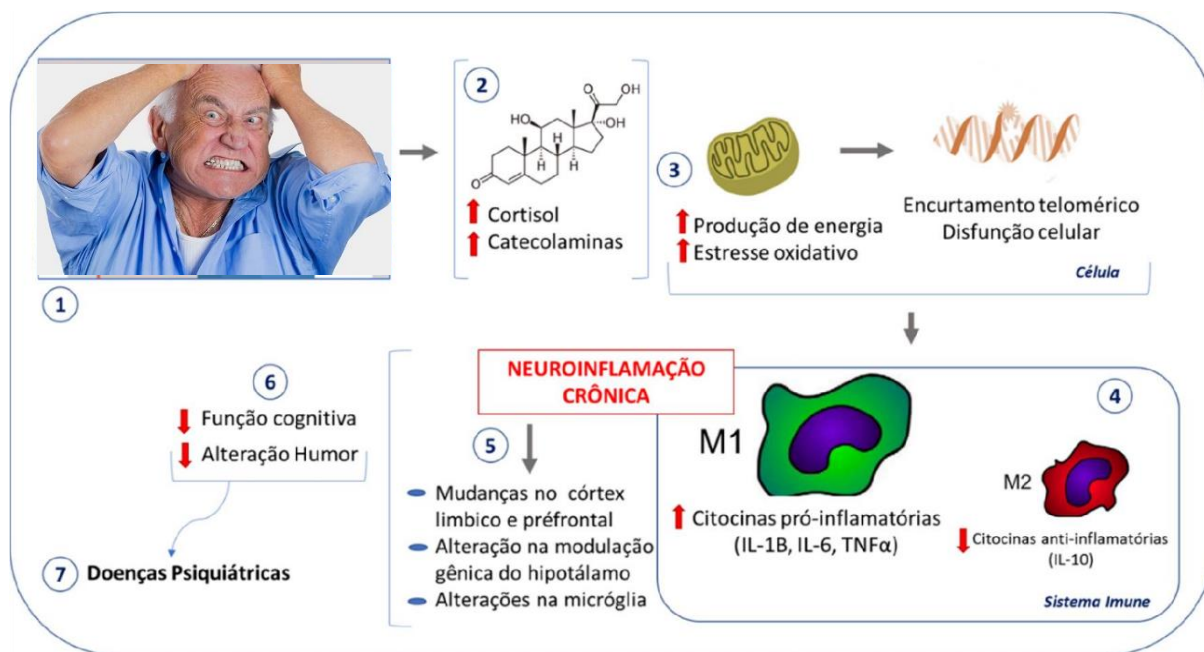


Fonte Adaptado de: Arsenis et al., 2017

A busca pelo entendimento dos mecanismos causais associados ao impacto do estresse crônico de origem psicossocial na saúde e longevidade humana tem mostrado que estes envolvem uma intrincada e complexa rede de reações moleculares, bioquímicas e fisiológicas, como mostra a figura 8. As quais incluem: (1) aumento nos níveis do estresse crônico (ASCHBACHER et al; 2013) provavelmente relacionados a disfunção mitocondrial desencadeada pela exposição

continuada ao cortisol (GONG et al; 2011; VICÁRIO et al; 2012; QUIIJE et al; 2015); (2) senescência celular, via encurtamento telomérico (RIDOUT et al., 2015; STEPTOE et al., 2017); (3) disfunção lisossômica prejudicando assim a autofagia, que é responsável pela digestão de resíduos metabólicos, ou mesmo de organelas danificadas incluindo mitocôndrias, que não são mais necessárias ao funcionamento celular (LU et al., 2017); (4) inflamação crônica de baixo grau (inflamação estéril), provavelmente desencadeada pelo aumento nas moléculas danificadas pelo estresse oxidativo e redução da autofagia dos resíduos metabólicos, que as chamadas Danger Patterns Molecules (DAMPs) desencadeiam respostas inflamatórias continuadas (STRAUB e CUTOLO, 2016; BAUER e TEIXEIRA, 2018).

Figura 8 Esquema geral dos principais mecanismos causais associados ao estresse psicossocial: (1) Exposição ao estresse contínuo; (2) liberação constantemente de cortisol e catecolaminas para a circulação; (3) indução do aumento na produção de energia pela mitocôndria e subsequente aumento no estresse oxidativo que gera danos nas organelas celulares incluindo no DNA, encurtamento telomérico e disfunção celular sistêmica; (4) Esse contexto leva a indução de quadros inflamatórios crônicos com aumento na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias; (5) no encéfalo se estabelecem processos neuroinflamatórios e aumento do estresse oxidativo que geram mudanças disfuncionais; (6) ocorre diminuição da função cognitiva, alterações emocionais incluindo oscilação do humor; (7) aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas.



Fonte: A autora.

Em termos fisiológicos, o HPA (eixo hipotálamo-pituitária-adrenal) é governado pela secreção do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e da vasopressina (ADH) secretados pelo hipotálamo, mais especificamente pelas células do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN).

Esses dois hormônios têm a capacidade de ativar a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) que é produzido pela hipófise. Por sua vez, o ACTH age diretamente no córtex da glândula adrenal que libera os hormônios glicocorticóides associados a resposta ao estresse. Os hormônios glicocorticóides, agem sobre diversos tecidos corporais via receptores específicos, tendo o principal hormônio glicocorticóide, o cortisol, suas principais ações no metabolismo energético, uma vez que sua liberação ativa mecanismos catabólicos que levam a um aumento nos níveis de insulina e glicose no sangue, a fim de preparar o indivíduo para responder rapidamente ao agente estressor (DELL'OSSO, et al; 2011).

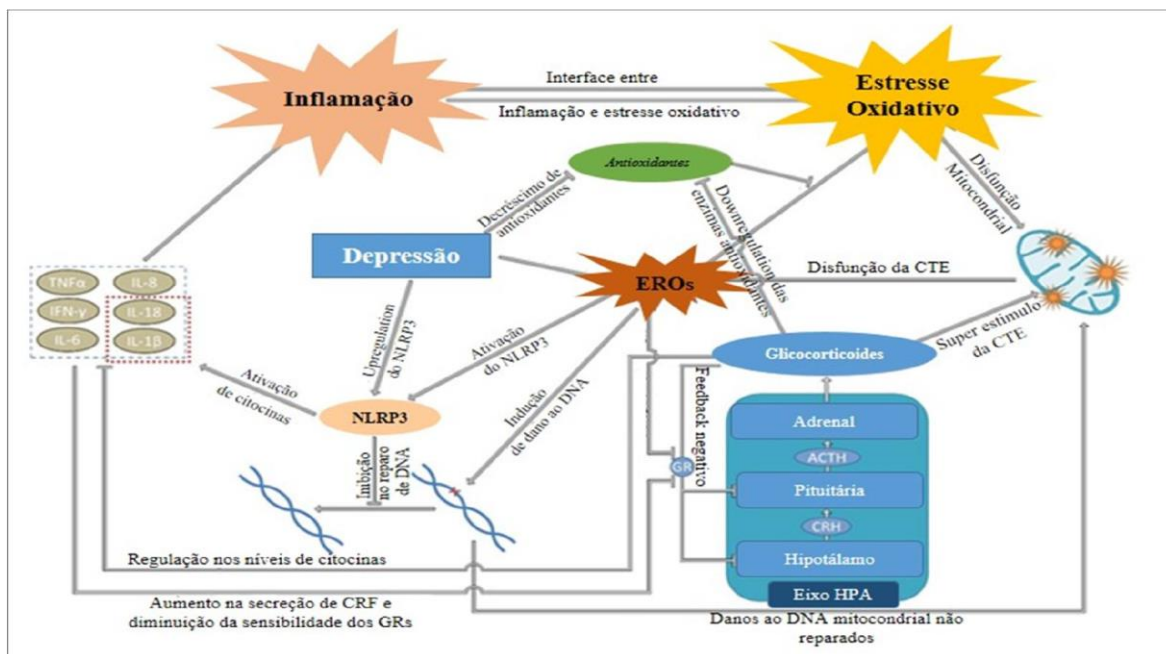
O cortisol é um hormônio esteroide e, portanto, sintetizado a partir do colesterol, pelas glândulas adrenais. Em nível tecidual, o cortisol atua nos músculos, mantém a função deste tecido, ainda que diminua a massa muscular proporcional do corpo; diminui a produção e aumenta a degradação óssea; em geral, diminui a quantidade de tecido conjuntivo; nos rins aumenta a filtração glomerular e a depuração da água; no sistema circulatório mantém o débito cardíaco, aumenta o tônus das arteríolas e diminui a permeabilidade endotelial (ONU, 2018)

Em níveis fisiológicos e basais um efeito bastante importante do cortisol ocorre também no sistema imune, uma vez que esse hormônio funciona como uma molécula imunossupressora diminuindo a resposta inflamatória e também alterando a resposta imunológica adquirida (DIÁCONO, et al, 2017).

Entre os adultos mais velhos, 63% relatam o estresse como fonte primária de doenças crônicas. A elevação crônica de hormônios do estresse, principalmente do cortisol, afeta a função cognitiva através de vários mecanismos incluindo a degeneração e morte neuronal. Estudos já demonstraram associação entre níveis elevados de cortisol e doença de Alzheimer, Parkinson, desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica entre outras patologias associadas ao envelhecimento (CRUZ, 2015).

Durante períodos de estresse intenso, popularmente as pessoas parecem ter "envelhecido perante nossos olhos." Esta percepção reflete muito bem a crença cultural generalizada de que o estresse psicológico crônico pode acelerar o processo de envelhecimento, como mostra o esquema na figura 9.

Figura 9: A inflamação e o estresse oxidativo são rotas que se retroalimentam.



Fonte: Adaptada de CZARNY, et al., 2017.

Estudos sobre o mecanismo causal do estresse psicossocial sobre a saúde, longevidade e desenvolvimento de transtornos psiquiátricos sugerem que o mesmo está associado a altos níveis de estresse oxidativo. (IRIE et al., 2003; EPEL et al., 2004; FORLENZA e MILLER, 2006; GIDRON et al., 2006) De fato, o organismo realiza sua adaptação central ao estresse via modulação direta do metabolismo energético. Entretanto, essa modulação envolve concomitantemente produção de energia pelas mitocôndrias e também aumenta os níveis de moléculas oxidativas gerando estresse oxidativo (PICARD et al., 2015). No caso do estresse psicossocial crônico, parece que a liberação crônica de glicocorticóides e catecolaminas na circulação, em consequência à resposta ao estresse ativo, produz alterações citológicas que induzem estresse oxidativo. Por sua vez, o estresse oxidativo predispõe à ocorrência de uma resposta inflamatória sistêmica crônica e também ao encurtamento telomérico (GOUIN et al., 2008; HUMPHREYS et al., 2012; KIRSTIN et al., 2013; TONINI, 2013).

2.5 Papel da dieta na prevenção de DCNTs associadas ao envelhecimento

Levando em consideração o aparente papel de proteção de moléculas antioxidantes frente ao encurtamento telomérico e tendo em vista que o abacate têm um alto teor de fitoquímicos especialmente antioxidantes com potencial efeito neuroprotetor, além de conter grande quantidade do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 (PUFA n-3), que parece estar associada com a proteção ao estresse psicossocial, transtornos psiquiátricos e neurodegenerativas, sugere-se que esta molécula tem um papel crítico na estrutura e função cerebral (AMEER et al; 2016).

O PUFAs n-3 constitui um dos principais fatores reguladores da neurotransmissão, neurogênese, sobrevivência celular e controle da neuroinflamação. Também é importante destacar

que sua deficiência tem sido associada com vários distúrbios psiquiátricos, incluindo o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia, depressão maior e demência do tipo Alzheimer (DIÁCONO et al; 2017).

O PUFA n-3 tem um papel importante na regulação da resposta ao estresse influenciando diretamente o eixo HPA. A deficiência de PUFA n-3 deste elemento nutricional pode induzir um estado de estresse crônico via interrupção da retroalimentação negativa que o cortisol exerce sobre o eixo (DIÁCONO et al; 2017; DU et al; 2016).

Geralmente, a suplementação de PUFA n-3 é feita com óleo de peixe. O peixe é uma excelente fonte de energia, com proteínas de ótima qualidade, vitaminas e minerais, desempenhando um importante papel na promoção de saúde e prevenção de doenças (GIL e GIL, 2015).

Contrapondo os potenciais benefícios para a saúde, com a ingestão de peixe na alimentação, certos poluentes químicos, como metais pesados e alguns compostos orgânicos presentes nos frutos do mar, é uma questão que merece preocupação. Existem evidências de resultados adversos no neurodesenvolvimento de lactentes e crianças jovens associados a exposição ao metil-mercúrio durante o desenvolvimento fetal devido ao consumo de peixe por parte das gestantes durante a gravidez (GIL e GIL, 2015).

Entretanto, existem outros alimentos vegetais que poderiam potencialmente apresentar efeito na modulação do estresse psicossocial considerando a sua matriz nutricional, como é o caso do abacate (*Persea americana*), um fruto amplamente distribuído em todas as regiões do Brasil, o qual se apresenta ilustrado na figura 10 (DU et al; 2016).

Uma vez que o abacate possui um conjunto de fitonutrientes com efeito antioxidante, torna-se relevante realizar estudos *in vitro* sobre o potencial efeito da suplementação com óleo de abacate em modelo neuronal de estresse e degeneração, e modelo neuronal de inflamação.

Figura 10: Figura ilustrativa da árvore de abacate ou abacateiro.



Fonte: Adaptado de Embrapa, 2010

Em termos nutricionais o abacate é uma fruta energética com alto valor nutricional sendo rica em proteínas, vitaminas lipossolúveis como a vitamina A, B, ainda níveis moderados de vitamina E e D. O abacate possui um valor nutricional quatro vezes maior que outros frutos, com exceção da banana. Possui também níveis elevados de potássio (cerca de 339 mg/100g) quando comparado a outros frutos e também é boa fonte de glutathione, considerada uma molécula altamente antioxidante (DU et al; 2016).

Em uma investigação Ortiz-Avila e colaboradores (2015), descreveram que o óleo de abacate foi capaz de proteger o fígado contra disfunção na cadeia de transporte de elétrons em ratos diabéticos. Em 2017, esses autores publicaram a continuidade dessa investigação, na qual mostraram que o óleo de abacate foi capaz de diminuir a hiperglicemia de ratos diabéticos para níveis intermediários entre os encontrados nos controles e nos diabéticos não suplementados. Os ratos suplementados também apresentaram melhora na função mitocondrial (ORTIZ-AVILA et al; 2017).

Uma vez que o abacate possui um conjunto de fitonutrientes com efeito antioxidante, Ameer (2016) sugeriu que a suplementação com este alimento poderia ter potencial efeito neuroprotetor em doenças como Alzheimer e Parkinson. Apesar desta sugestão, até o presente momento estudos sobre o potencial efeito da suplementação com abacate ou seu óleo em neurônios, bem como na modulação do cortisol não foram conduzidos com maior profundidade.

2.6 Matriz química do abacate

O ômega 3 (PUFA n-3) parece ter um papel importante na regulação da resposta ao estresse influenciando diretamente o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Larrieu e colaboradores (2016), sugeriram que a deficiência deste elemento nutricional poderia induzir um estado de estresse crônico via interrupção da retroalimentação negativa que o cortisol exerce sobre o eixo. Ao contrário, a suplementação durante 9 meses com PUFA n-3 atenuou a disfunção do eixo HPA. Outro estudo conduzido por Ferraz e colaboradores (2011) mostrou que a suplementação com PUFA n-3 diminuiu os níveis plasmáticos de corticosterona induzidos pelo estresse, assim como também diminuiu comportamentos de ansiedade e similares a depressão.

O ômega 3 também parece exercer ação anti-inflamatória, já que consegue interferir na produção de moléculas pró-inflamatórias como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (PUSCEDDU et al., 2016). Assim como também, tem a capacidade de inibir a liberação de citocinas pro-inflamatórias como o interferon gama (INF- γ), TNF α , IL-1B, IL-2 e IL-6, uma vez que age diretamente sobre o fator de transcrição NF kappa Beta (NF-K β) (KANG e WEYLANDT, 2008).

O BDNF (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*), pertence à família das neurotrofinas que age diretamente na neurogênese e também na sobrevivência neuronal, atuando sobre alguns tipos de neurônios do SNC e do sistema nervoso periférico auxiliando na manutenção funcional e permitindo também o crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses. No cérebro, o BDNF está especialmente ativo no hipocampo, córtex e tronco cerebral (SCHEIDT et al., 2015). Estudos têm mostrado que, além dos efeitos da suplementação com ômega 3 sobre a modulação do cortisol e do metabolismo inflamatório, essa molécula age na regulação dos níveis de BDNF. (RAO et al., 2007).

Nutricionalmente o abacate é uma fruta energética com alto valor nutricional, é rica em proteínas, vitaminas lipossolúveis como a vitamina A, B, e níveis moderados de vitamina E e D, como mostra a Tabela 1. Também é boa fonte de glutathiona, considerada uma molécula altamente antioxidante (WANG et al., 2012).

O abacate apresenta quantidades substanciais de compostos bioativos incluindo fito esteróis como o b-sitosterol e se caracteriza por possuir elevada quantidade de ácidos graxos e ter um alto valor energético, assim como mostra a tabela 1. Este fruto também pode dar origem ao óleo de

abacate, o qual possui semelhança com o azeite de oliva e que além de possuir na sua composição ômega 3, é rico principalmente em ácido graxo oleico (ômega 9) e b-sitosterol, uma gordura insaturada utilizada como suplemento coadjuvante no tratamento das hiperlipidemias e também na síndrome metabólica (TABESHPOUR et al., 2017).

Outros estudos, também indicam que o β -sitosterol presente no abacate possui efeito relevante na imunidade, contribuindo no tratamento de doenças como o câncer, AIDs e outras infecções, devido ao fato dessa molécula aumentar a proliferação de linfócitos e a atividade das células natural-killers que são de grande relevância para inativar a infecção por microorganismos (CHOUDHARY et al; 2011e BIN et al; 2015).

Tabela 1 Compilação de dados sobre a composição nutricional, de ácidos graxos e compostos fenólicos presentes no abacate (*Persea americana*).

Especificação	Valor	Referência
Abacate cru (/100 g polpa)		TACO (2016)
Energia (Kcal/100 g)	96	
Proteína (g)	1,2	
Lipídeos (g)	8,4	
Carboidratos (g)	6,0	
Fibra alimentar (g)	6,3	
Micronutrientes (mg)		Daiuto et al (2013)
Fosfóro	2,1	
Potássio	17,3	
Cálcio	0,3	
Manganês	6,3	
Magnésio	0.87	
Ferro	12	
Zinco	21,6	
Vitaminas e outros micronutrientes/g)		TACO (2016)
Acido Ascórbico (Vitamina C) (mg)	8,8	
Tiamina (mg)	0.075	
Riboflavina (mg)	0.143	
Niacina (mg)	1.912	
Vitamina B6 (mg)	0.287	
Acido Fólico (μ g)	89	
Vitamina K (μ g)	21	
Tocoferol (Vitamina E) (mg)	1.97	

Especificação	Valor	(Continuação) Referência
Vitamina A (atividade equivalente de retinol)	7	
Luteína + zeaxantina (µg)	271	
Betacaroteno (µg)	63	
Ácidos Saturados (g)	2,3	
Ácidos Monoinsaturados (g)	4,3	
Ácidos Poliinsaturados (g)	1,4	
Ácidos graxos (polpa) (/100g)		
Palmítico (16:0) (g)	24,2	Tango et al (2004)
Oleico (18:1) (g)	53,4	
Linoleico (18:2) (g)	13,2	
Óleo de Abacate (g/100 g de óleo)		Massafera et al (2010)
Ácido Mirístico (14:0) (g)	0,30	
Palmítico (16:0) (g)	32,5	
Oleico (18:1)	31,7	
Linoleico (18:2)	19,2	
Linolênico (18:3)	4,05	
B-sitosterol (%)	83,5	Soares & Ito (2000)
Colesterol (%)	1,5	
Outros (%)	13,3	
Compostos Fenólicos (mg/100 g)		Oboh et al (2014)
Epicatequina	46,8	
Epigallocatequina	34,8	
Epigallocatequina-galato (EGCG)	6,03	
Apigenina	2,84	
Naringenina	1,86	
Campferol	8,7	
Ácido Ferrúlico	11,07	
Ácido Vanílico	14,5	
Ácido Siringico	5,6	
Lupeol	19,7	
Quercetina	4,6	
Rutina	2,8	

Fonte: Kosińska e colaboradores (2012)

A matriz química do abacate possui alguns componentes, que além da ação antioxidante e anti-inflamatória também atuam sobre a modulação do cortisol e provavelmente do estresse psicossocial. Este é o caso da apigenina, catequinas, em especial a epigallocatequina-galato (EGCG), campferol, luteína/zeaxantina e do ácido ascórbico, moléculas essas que possuem ação antioxidante e anti-inflamatória bem estabelecidas (MELGAREJO et al., 2010; KHURANA et al., 2013; VIZZOTTO, 2017).

Entretanto, como mencionado anteriormente, até o presente momento estudos sobre o potencial efeito da suplementação com abacate ou seu óleo em células neurais, bem como na modulação do cortisol não foram apresentados.

3 MATERIAIS E METODOS

O delineamento metodológico geral é apresentado considerando o manuscrito que compõe a presente dissertação.

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biogenômica, na Universidade Federal de Santa Maria-UFSM.

3.1 Delineamento do estudo

Foi conduzido um estudo de caráter experimental *in vitro*, utilizando a linhagem neuronal-like (SH-SY5Y) adquirida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro, proveniente da The American Type Culture Collection(ATCC®). As células neurais foram tratadas com óleo de abacate nas concentrações de (2. 5.10. 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas de incubação. A menor concentração que não causou queda na viabilidade celular e/ou causou aumento na proliferação foi 5 $\mu\text{g/mL}$, considerada de escolha. A capacidade antioxidante e anti-inflamatória do óleo de abacate foi analisada.

O cortisol, obtido comercialmente via Sigma Aldrich, foi utilizado nas seguintes concentrações: 0, 0.1, 0.3, 1, 3 ou 10 ng/mL , para a curva de definição da concentração utilizada nos experimentos por 24 horas. Após a incubação, foi avaliado o efeito na taxa de viabilidade celular. E a concentração de escolha para o seguimento dos experimentos foi 1 ng/mL .

Uma vez determinadas as concentrações, foram realizados novos experimentos, em que as células neuronais foram expostas concomitantemente ao cortisol e ao óleo de abacate a fim de se mensurar os marcadores relacionados à estresse oxidativo, apoptose, níveis da molécula neurogênica BDNF e antioxidantes.

3.2 Proveniência do óleo de abacate

Foi adquirido da Stem Pharmaceutical Suplementos Alimentares Ltda (CNPJ 04.056.093/0001-27) com indústria situada em Porto Alegre-RS, número do cadastro na ANVISA: 04.056.093/0001-27, com suplemento registrado no Ministério da Saúde com o número 6.6969.0008.001-4. A empresa está em situação ativa para fabricar, armazenar, distribuir e transportar suplementos alimentares. O óleo tem como forma de apresentação cápsulas gelatinosas moles, embaladas em frascos plásticos com 60 unidades contendo 1000 mg de óleo de abacate. Informações adicionais do produto podem ser obtidas na página: [http://www.stem.com.br/produtos.php?produto=160&titulo=Oleo-de-abacate Oleo-de-abacate-1000-mg](http://www.stem.com.br/produtos.php?produto=160&titulo=Oleo-de-abacate%20Oleo-de-abacate-1000-mg).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram conduzidas através da utilização do software GraphPadPrism5. Os resultados dos tratamentos comparados por análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias conforme o caso, seguida pelo teste post hoc de Tukey ou de Dunnet. Os resultados das análises foram expressos como média \pm desvio padrão, e aqueles resultados com $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito:

- Manuscrito submetido a revista Plant Foods For Human Nutrition (Dordrecht)(fator de impacto 2.598), classificação A2- Capes Qualis Periódicos

5.1 Manuscrito

Avocado oil (*Persea americana*) protects neural cells against oxidative stress and apoptosis induction triggered by cortisol

Concise Title: Neuroprotection of avocado oil against cortisol

Jéssica Rosso Motta^{1#}, Ivo Emilio da Cruz Jung^{2#}, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2}, Verônica Farina Azzolin¹, Cibele Ferreira Teixeira², Luiza Elizabete Braun³, Daniel Augusto De Oliveira Nerys³, Marco Aurélio Echart Motano⁴, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^{2,5}, Ednea Aguiar Maia-Ribeiro⁶, Fernanda Barbisan^{1,2*}

¹ Graduate Program in Gerontology, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- Brazil.

² Pharmacology Graduate Program, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- Brazil.

³ Biogenomics Laboratory, Department of Morphology - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- Brazil.

⁴ Graduate Program Sanitary and Animal Production, Universidade do Oeste de Santa Catarina. Xanxerê Brazil.

⁵ Health Sciences Center, Universidade Luterana do Brasil. Santa Maria- Brazil

⁶ Research Department, Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade do Amazonas- Manaus- Brazil.

The authors contributed equality to present study

*Corresponding author: Address: Roraima Avenue, 1000, Building 51, Room: 2032. Universidade Federal de Santa Maria. Zip Code: 97105-900. Email: fernandabarbisan@gmail.com

Abstract

Cortisol exposure induced by chronic psychosocial stress is a very common condition in the contemporary World. Some foods components, such as avocado oil (AO), richest in unsaturated fatty acids could attenuate detrimental cortisol effects on neurons by modulation of oxidative stress and apoptosis. Methods: to test this hypothesis an in vitro experimental model using SH-SY5Y cell lines hydrocortisone (HC) exposed was developed here. Cell cultures exposed to 5 ng/mL HC presented higher mortality, increase in oxidative markers and alterations in the protein and gene expression of antioxidant enzymes. Moreover, HC induced overexpression of Bax, Bcl-2, and caspases 3 and 8 protein and genes suggesting apoptosis induction. When cells were concomitantly supplemented with HC and AO, cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis induction were significantly attenuated. The role of results suggest that AO could exert neuroprotective effects against psychosocial stress that is a risk factor to acceleration of brain aging and developing of neurodegenerative diseases, such Alzheimer.

Key-words: Fatty acids, nutrigenomics, psychosocial stress, apoptosis, oxidative stress

1. INTRODUCTION

Psycho-social stress response is regulated by hypothalamic-pituitary axis (HPA) by increase in plasmatic cortisol. However, in chronic stress situations high cortisol concentrations trigger negative effects promoting alterations in the mood, anxiety, appetite, sleep, as well as cognition. Furthermore, in normal aging there is some changes in cortisol circadian rhythm levels associated with mood and cognitive dysfunctions in

elderly people [1]. Perhaps for this way of action chronic exposure to elevated cortisol levels has been associated with detrimental effects on cognition contributing to Alzheimer disease pathology and mood disorders prevalent in elderly people [2,3].

The omega-3 and omega-6 polyunsaturated and omega-9 monounsaturated fatty acids are important nutrients and major components of neuronal cell membrane. Therefore, foods richest in some unsaturated fatty acids and other bioactive molecules could attenuate negative effects of chronic cortisol-exposure. This is the case of avocado oil (AO) that presents a wide variety of lipids mainly composed by triacylglycerol's, such as monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids [4]. Previous evidence described beneficial AO effects on neural development and functions [5, 6, 7]. Moreover, there are some studies suggesting a neuroprotective action of AO including damage on sensory hair cells in the cochlea, that are involved in the sensorineural hearing loss, triggered by neomycin-exposure [8].

Therefore, we performed here an *in vitro* protocol that evaluated the AO effects against cytotoxic and genotoxic damage triggered by hydrocortisone (HC) exposure in a neural SHSY-5Y commercial cell line.

MATERIALS AND METHODS

The material and methods section is presented as supplementary material.

2. RESULTS AND DISCUSSION

Initially, the effect of different concentrations of HC and AO on viability of neuron cells was analyzed (Figure 1). HC exposure tended to decrease cell viability in a dose-

dependent manner. On the other hand, neural cells exposed to different OA concentrations showed similar viability to the control group.

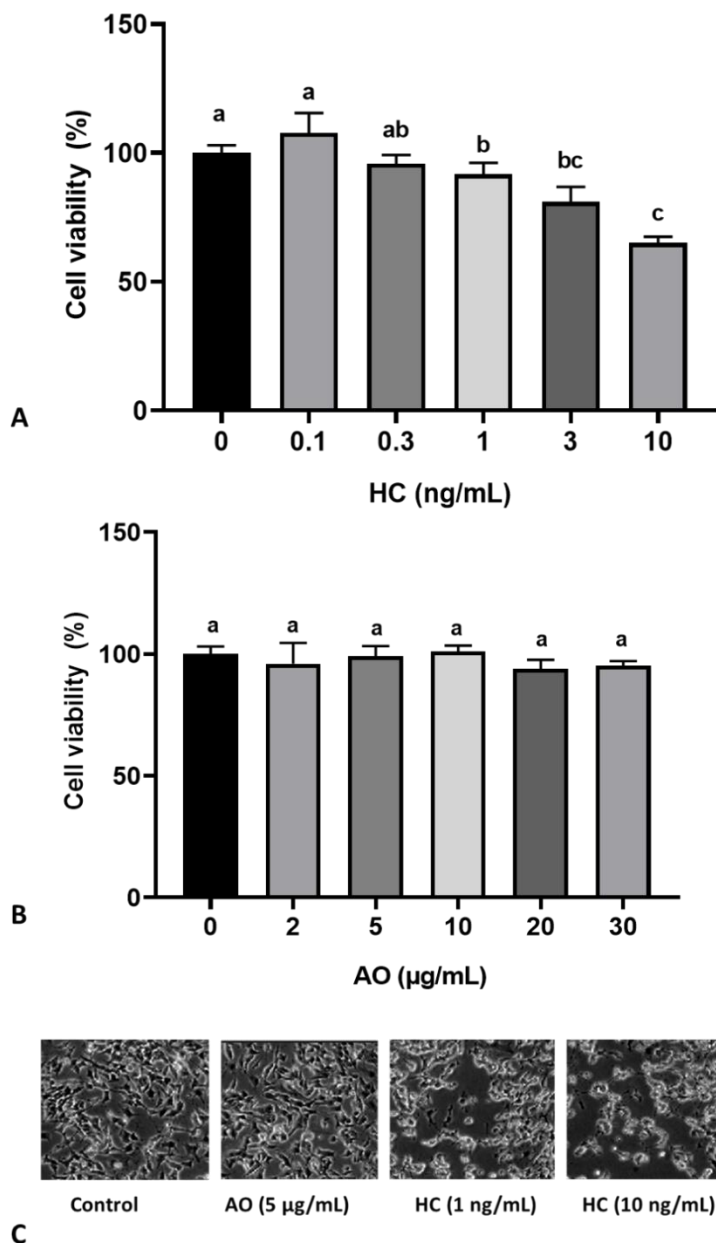


Figure 1 Viability comparison by MTT-assay by SHSY-5Y neural 24 h cultures. (A) hydrocortisone (HC) exposure; (B) avocado oil (AO) exposure; (C) representative optic microphotographs of neural cultures (20 x) exposed to AO, HC and HC plus AO. Statistics comparison were performed by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Statistical differences ($p \leq 0.05$) among each culture exposed to different HC or AO concentrations are represented by different letters (a,b,c).

Complementary analyzes were performed to observe the cytoprotective effect of OA on different HC concentrations. Considering that lower HC concentration tested here (0.1 ng/mL) did not affect neural cell viability, we did not perform analysis on viability of cultures concomitantly exposed to HC plus AO at this concentration. Cell cultures 0.3 ng/mL exposed and AO supplemented at 2 to 10 $\mu\text{g/mL}$ concentrations showed significant increase in the viability than cultures just exposed at this HC-concentration or AO-supplemented at $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ (Figure 2A).

In the cultures concomitantly exposed to HC at 1.0 ng/mL (Figure 2B), 3.0 ng/mL (Figure 2C) and 10.0 ng/mL (Figure 2D) all AO-concentrations increased viability than cultures just treated with each different HC-concentrations tested here.

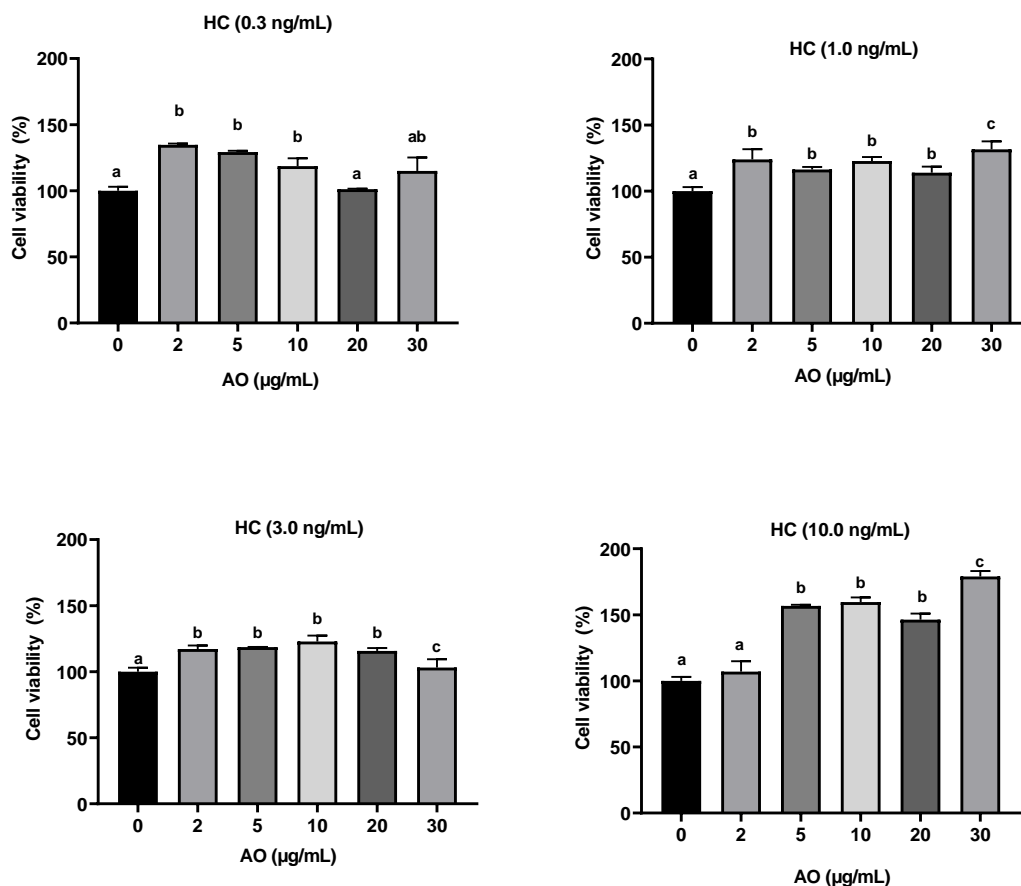


Figure 2 Viability comparison by MTT-assay by SHSY-5Y neural 24 h cultures concomitantly exposed to different hydrocortisone (HC) concentrations and five avocado oil (AO) concentrations. (A) cell cultures exposed to HC at 0.3 ng/mL; (B) cell cultures exposed to HC at 1 ng/mL; (C) cell cultures exposed to HC at 3 ng/mL; (D) cell cultures exposed to HC at 10 ng/mL; Statistics comparison were performed by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Statistical differences ($p \leq 0.05$) among each culture exposed to different HC or AO concentrations are represented by different letters (a,b,c).

When neuron cultures were concomitantly exposed to HC at 1.0 ng/mL (Figure 2B), 3.0 ng/mL (Figure 2C) and 10.0 ng/mL (Figure 2D) all AO-concentrations increased viability than cultures just treated with each different HC-concentrations tested here.

From these results we choose HC at 10 ng/mL concentration and AO at 5 μg/mL concentration to perform additional analysis. The levels of oxidative markers and antioxidant enzymes were compared between control and neural cell cultures exposed to

AO, HC and AO plus HC. Gene expression of antioxidant enzymes were also compared among treatments.

Cultures just HC-exposed presented higher levels of nitric oxide (NO), ROS, lipoperoxidation (LPX) and protein carbonylation than untreated control group (Figure 3A). Cultures just exposed to AO also presented higher levels than NO than control group whereas ROS levels were lower than control group. LPX and protein carbonylation showed similar values between control group and cultures just AO-exposed. When cultures were concomitantly exposed to AO and HC, NO, ROS and LPX returned to similar levels than control group, whereas protein carbonylation decreased levels were lower than control group. DNA oxidation (oxDNA) levels were significantly lower in cultures just AO-exposed and higher in cultures just HC-exposed. The concomitant treatment decreased partially oxDNA levels, but were significantly higher than control group. In summary, HC-exposure present more number oxidative markers with higher levels than control group, whereas AO-exposure presented a heterogenous action depending of each oxidative marker analyzed. In general, concomitant HC and AO treatment reverted oxidative stress triggered for HC-exposure, including potential genotoxicity evaluated by oxDNA levels.

A significant increase of antioxidant enzymes levels was observed in all treatments than control groups (Figure 3B). This effect was higher in cultures concomitantly HC plus AO-exposed. Gene expression analysis also showed a significant over expression of SOD-2 and GPX in all treatments than control, and in CAT of cultures HC and HC plus AO exposed.

Considering that HC-exposure triggered higher mortality in neural cells than control group, we evaluated potential apoptotic induction by analysis of key-molecules in this process. As can see in Figure 4, BAX and Bcl-2 levels were elevated in neural cultures

just HC-exposed, but in cultures concomitantly treated with HC plus AO the BAX returned to similar levels than untreated control group. Casp-3 and Casp-8 levels also increased significantly in cells just HC-exposed, but these results were partially reverted when cultures were concomitantly exposed to HC plus AO. Gene expression analysis showed no effect on BAX and Bcl-2 genes. However, Casp-3 and Casp-8 were overexpressed in both HC and HC plus AO cell cultures.

Finally we compared the levels of neurogenic BDNF molecule among treatments. Control group presented 35 ± 3.2 pg/mL whereas cultures just AO-exposed presented similar (38 ± 4.2 pg/mL) BDNF levels than control group ($p=0.430$). In neural cultures HC-exposed BDNF levels dropped 51.2% (18 ± 2.2 pg/mL) than control group. Concomitant HC plus AO treatment reverted partially the HC action on BDNF (25.18 ± 2.9 pg/mL).

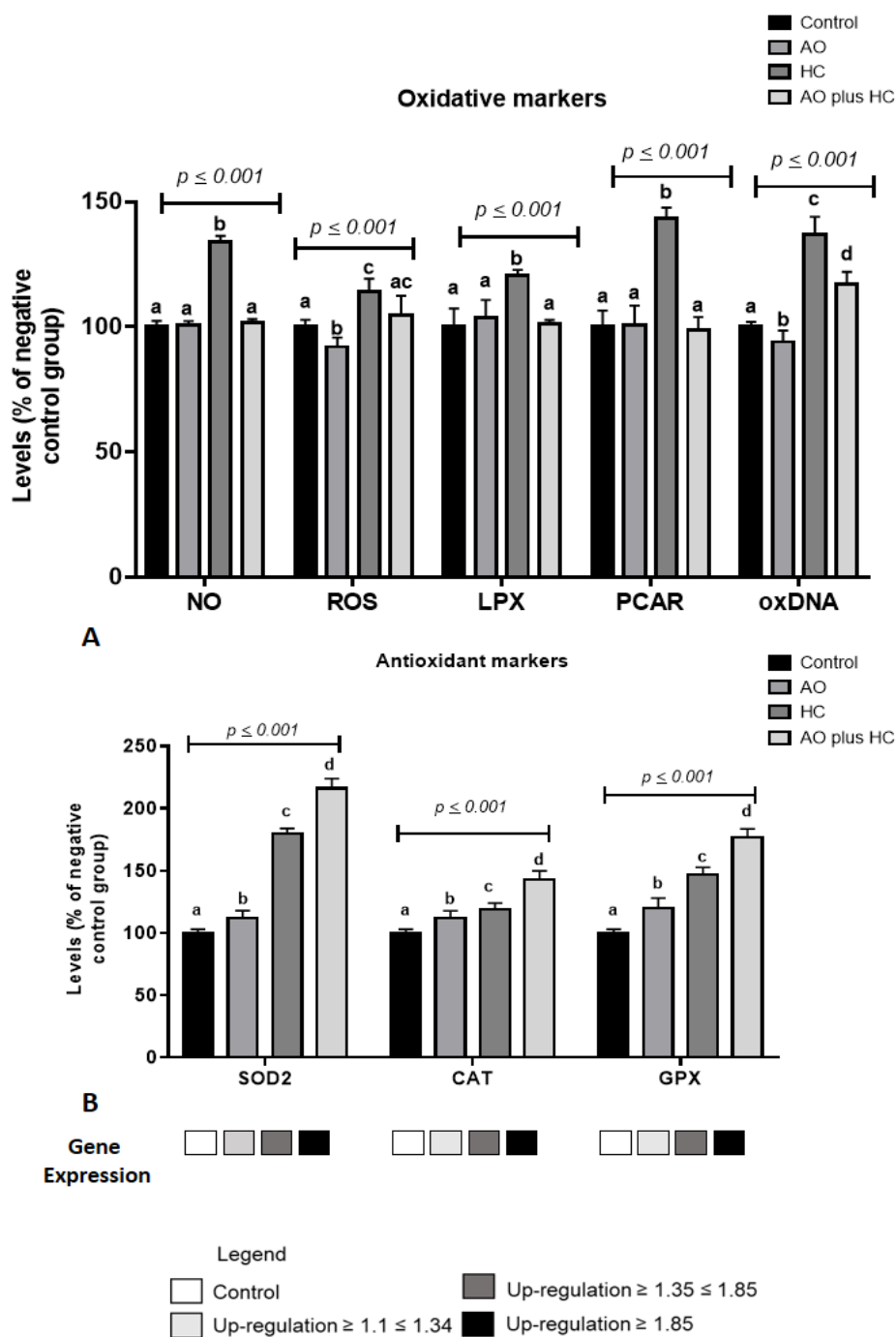


Figure 3 Comparison of oxidative markers and antioxidant enzymes (protein and gene expression) of SHSY-5Y neural cultures exposed to hydrocortisone (HC, 1 ng/mL), avocado oil (AO, 5 μ g/mL) and concomitantly HC plus AO exposed at same individual concentrations. (A) oxidative markers: NO = nitric oxide; ROS = reactive oxygen species; LPX = lipoperoxidation quantified by TBARS levels; PCAR = protein carbonylation; oxDNA = DNA oxidation quantified by 8-deoxyguanosine levels. (B) antioxidant enzymes: SOD = superoxide dismutase; CAT = catalase; GPX = glutathione peroxidase. In Gene expression β -actin is housekeeping gene. Statistics comparison were performed by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Statistical differences ($p \leq 0.05$) among each culture exposed to different treatments are represented by different letters (a,b,c) for each variable analysed here.

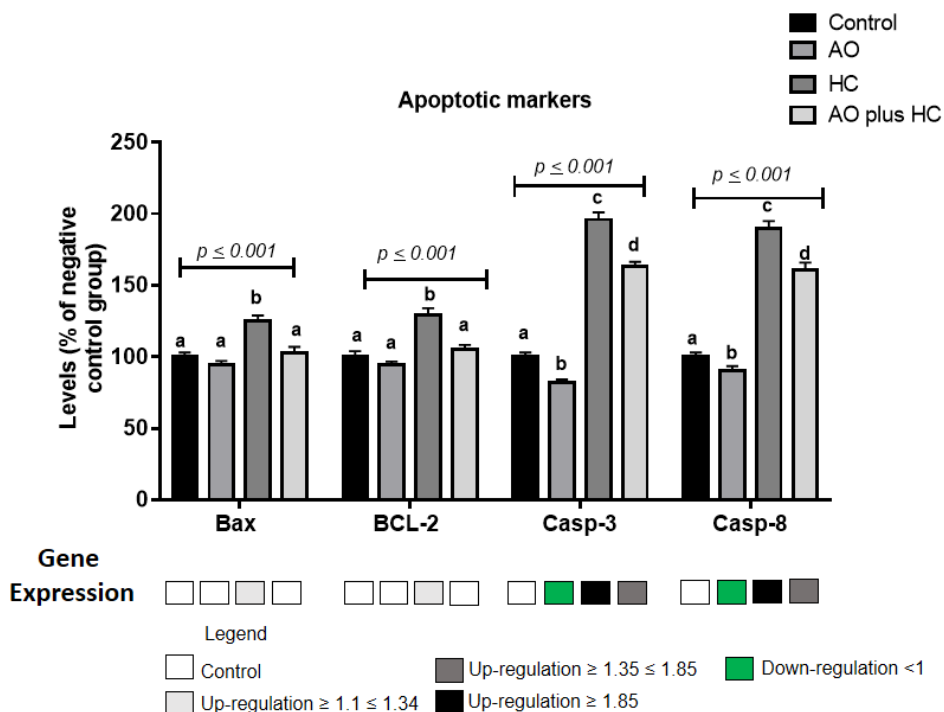


Figure 4 Comparison of apoptotic markers (protein and gene expression) of SHSY-5Y neural cultures exposed to hydrocortisone (HC, 1 ng/mL), avocado oil (AO, 5 μ g/mL) and concomitantly HC plus AO exposed at same individual concentrations. Bax = BCL2 Associated X; Bcl-2 = B-cell lymphoma 2; CASP = caspases. In Gene expression β -actin is housekeeping gene. Statistics comparison were performed by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Statistical differences ($p \leq 0.05$) among each culture exposed to different treatments are represented by different letters (a,b,c) for each variable analysed here.

In the present study we investigated potential AO effect on some neurocytotoxic action of chronic HC-exposure using an SHSY-5Y *in vitro* model. In order to perform this analysis initially an *in vitro* protocol was established by HC-exposure at different concentrations. HC-exposure induced neuron mortality in a dose dependent way. Therefore, these results corroborate previous evidences that described deleterious effects of high cortisol on the brain structures, that can contribute to neurodegenerative process and development of some chronic diseases, such as Alzheimer [9]. On the other hand, concomitant HC and AO-exposure decreased mortality triggered by HC and also

modulated differentially oxidative, antioxidant and apoptotic markers in these cells. In the following we will comment on these results in more detail.

Since an *in vitro* model has been developed with SHSY-5Y cells exposed to cortisol it is important to make some considerations about it. These cells that are often used as *in vitro* models of neuronal function and differentiation. SHSY-5Y cells present an adrenergic phenotype, however also express dopaminergic and for this reason are considered *in vitro* models for Parkinson's Disease [10]. Mitochondrial dysfunction induced by some chemicals are used to *in vitro* simulate psychiatric disorders, such as bipolar and schizophrenia [11, 12]. Different neurogenesis analysis can be performed using this cell line [13]. Furthermore, SHSY-5Y cells have been also used to test effect of some fruits extracts or their isolated bioactive molecules including grapefruit [14], açai [12], guaraná [15], moringin from moringa [16] among others.

In the organism, cortisol has a half-life of 60 to 90 minutes due to the high degree of plasma protein binding that reduces the rate of plasma glucocorticoid clearance [17]. As the added HC in the culture medium does not have such an efficient clearance system, cells remain much longer exposed to this hormone. Therefore, we considered that the experimental procedure described here using a model that SHSY-5Y were HC-exposure for more than 24 h presents some similarities to chronic stress conditions *in vivo* on neuron cells.

In fact, our results showed that HC triggered increase in the mortality from ≥ 0.3 ng/mL concentration, probably inducing oxidative stress and apoptotic events. Previous *in vitro* investigation also found similar results using co-culture of mouse myoblast (C2C12) and preadipocytes (3T3-L1) cell lines. After cortisol treatment for 3 days cells increased caspase expression such as observed here [18]. Cell death is associated

with acute and chronic neurodegenerative diseases that include a partial loss of neurons [19]. Moreover, continued cortisol exposure can induce oxidative stress [20] and cell death via apoptosis [21].

Mechanisms involved two main apoptosis to caspases activation. The intrinsic pathway involves mainly detection of cellular DNA damage, that increases Bax and decrease Bcl-2 levels inducing alterations of mitochondrial structure. The extrinsic pathway trigger apoptosis events mediated by transmembrane receptors (death receptors). However, both pathway activate execution apoptotic pathway by Casp-8 activation, that subsequently activates other caspases, such as Casp-3. In our study, increased levels of Bax, Bcl-2 and caspases 3 and 8 proteins were observed in cultures exposed only to HC. Gene overexpression of caspases was also observed in this treatment. These results did not allow us to clearly identify whether cortisol activated only one of the apoptotic routes, or even both routes. However, it left no doubt that death caused by neuronal cells involved increased oxidative stress, possible DNA damage and apoptosis induction. Especially increasing caspase 3 protein levels indicate that continued exposure to cortisol induces important dysfunctions, many of them associated with the brain aging and development of diseases such as Alzheimer's. For example, in the aging brain, Casp-3 activation is a common convergence point for a number of toxic triggers such as oxidative damage [22]. These results reinforced the idea that the chronic exposure model of SHSY-5Y cells to cortisol is valid and could be used to assess the protective impact of various types of food and their bioactive molecules.

This type of in vitro experimental model could be considered relevant since chronic psychosocial stress is a very common condition in the contemporary world. Most of response is mediated by the major stress hormonal HPA-axis. Within CNS, the

hippocampus, the amygdala and the prefrontal cortex as part of the limbic system are believed to present crucial roles in HPA axis-regulation [23; 1]. As cortisol has capacity to easily cross the blood-brain barrier arriving in the neurons and glia cells [24], the CNS exposure to cortisol is direct and fast. In adaptive terms, it is assumed that the response to a particular stressor is acute and highly resolvable, usually involving elements of fight or flight. Therefore, chronic exposure to stress that induces sustained high levels of cortisol in the body is highly detrimental. As commented by Russel and Lightman's review (2019) [25], long-term cortisol exposure becoming maladaptive, having been associated with development of metabolic syndrome, obesity, cancer, mental health disorders, cardiovascular disease and increased susceptibility to infections. Chronic psychosocial stress cannot be avoided in many situations, as it may involve family, work, or other continuing social activity. In this sense, strategies that mitigate the deleterious effects of stress are of great relevance. Among these, the use of dietary components is a factor that can assist this process including the use of AO.

Our results showed important AO neuroprotective action by reversing the mortality rates induced and also by decreasing oxidative stress and apoptosis events induced by HC-exposure. According to some studies, the AO is rich in β -sitosterol and acid oleic, an unsaturated fat used as an adjuvant in the treatment of hyperlipidemias [26]. Also, it closely resembles olive oil because it is extracted pulp and the similarity of their properties mainly due to the composition of their fatty acids, predominating in both oleic acid [5]. However, unlike olive oil that has been extensively studied for its neuroprotective properties [27] investigations into the effects of AO on neural function are incipient [28; 4; 8].

CONCLUSION

Therefore, despite methodological constraints associated with in vitro protocol, the results presented here in conjunction with these previous investigations suggest that AO could have relevant neuroprotective properties including attenuation of alterations triggered by psychosocial stress that induce chronic neural alterations by continued cortisol exposure.

Acknowledgments: The authors thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) by granting financial resources. We also thank all members of the Biogenomic Laboratory for their assistance in this research.

Compliance with Ethical Standards: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

3. REFERENCES

- [1] Yiallouris A, Tsioutis C, Agapidaki E et al (2019) Adrenal Aging and Its Implications on Stress Responsiveness in Humans. *Front Endocrinol (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00054>
- [2] Singer T, Engert V (2018) It matters what you practice: differential training effects on subjective experience, behavior, brain and body in the *ReSource Project*. *Curr Opin Psychol* 28: 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2018.12.005>
- [3] Veltman EM, Lamers F, Comijs HC et al (2018) Inflammatory markers and cortisol parameters across depressive subtypes in an older cohort. *Affect Disord* 234:54-58. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.02.080>

- [4] De Mello MFFT, Pereira DE, Moura RL et al (2019) Maternal Supplementation With Avocado (*Persea americana* Mill.) Pulp and Oil Alters Reflex Maturation, Physical Development, and Offspring Memory in Rats. *Front Neurosci* 23: 13-19. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00009>
- [5] Flores M, Saravia C, Vergara CE et al (2019) Avocado Oil: Characteristics, Properties, and Applications. *Molecules* 24(11). . <https://doi.org/10.3390/molecules24112172>
- [6] Bhuyan DJ, Alsherbiny MA, Perera S et al (2019) The Odyssey of Bioactive Compounds in Avocado (*Persea americana*) and Their Health Benefits. *Antioxidants (Basel)* 8(10): 426. <https://doi.org/10.3390/antiox8100426>
- [7] Ortega-Arellano HF, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C (2019) Neuroprotective Effects of Methanolic Extract of Avocado *Persea americana* (var. Colinred) Peel on Paraquat-Induced Locomotor Impairment, Lipid Peroxidation and Shortage of Life Span in Transgenic knockdown Parkin *Drosophila melanogaster*. *Neurochem Res*, 44(8):1986-1998. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02835-z>
- [8] Nam YH, Rodriguez I, Jeong SY, et al (2019) Avocado Oil Extract Modulates Auditory Hair Cell Function through the Regulation of Amino Acid Biosynthesis Genes. *Nutrients* 11(1). pii: E113. <https://doi.org/10.3390/nu11010113>
- [9] Ouanes S, Popp J (2019) High Cortisol and the Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Review of the Literature. *Front Aging Neurosci* 11:43. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00043>
- [10] Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>
- [11] Kim HK, Mendonça KM, Howson PA, (2015) The link between mitochondrial complex I and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y cells--The potential of JNX1001 as a therapeutic agent. *Eur J Pharmacol* 764:379-384. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.013>
- [12] Machado AK, Andrezza AC, da Silva TM et al (2016) Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8940850>
- [13] Kovalevich J, Langford D, (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol* 1078:9-21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- [14] Scola G, Laliberte VL, Kim HK et al (2014) *Vitis labrusca* extract effects on cellular dynamics and redox modulations in a SH-SY5Y neuronal cell model: a similar role to lithium. *Neurochem Int* 79:12-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.002>

- [15] Algarve TD, Assmann CE, Cadoná FC (2019) Guarana improves behavior and inflammatory alterations triggered by methylmercury exposure: an in vivo fruit fly and in vitro neural cells study. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(15): 15069-15083. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-019-04881-0>
- [16] Cirimi S, Ferlazzo N, Gugliandolo A et al (2019) Moringin from *Moringa Oleifera* Seeds Inhibits Growth, Arrests Cell-Cycle, and Induces Apoptosis of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells through the Modulation of NF- κ B and Apoptotic Related Factors. *Int J Mol Sci* 19: 20-28. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20081930>
- [17] Hindmarsh PC, Charmandari E (2015) Variation in absorption and half-life of hydrocortisone influence plasma cortisol concentrations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 82(4):557-561. <http://dx.doi.org/10.1111/cen.12653>
- [18] Muthuraman P (2014) Effect of Cortisol on Caspases in the Co-cultured C2C12 and 3T3-L1 Cells. *Appl Biochem Biotechnol* 173(4):980-988. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-0909-z>
- [19] Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A (2014) Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*. <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-132738>.
- [20] Aschbacher K, O'Donovan A, Wolkowitz OM et al (2013) Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9):1698-708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.004>
- [21] Latt HM, Matsushita H, Morino M et al (2018) Oxytocin Inhibits Corticosterone-induced Apoptosis in Primary Hippocampal Neurons. *Neuroscience* 379:383-389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.025>
- [22] Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, Cotman CW (2012) Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull* 28(1):14-24. <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-012-1057-5>
- [23] Pruessner JC, Dedovic K, Pruessner M et al (2010) Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations - 2008 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* 35(1):179-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.02.016>
- [24] Banerjee S, Bhat MA (2007) Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu Rev Neurosci* 30:235-258. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094345>
- [25] Russell G, Lightman S (2019) The human stress response. *Nat Rev Endocrinol* 15(9):525-534. <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0228-0>

[26] Tan CX, Chong GH, Hamzah H, Ghazali HM (2018) Effect of virgin avocado oil on diet-induced hypercholesterolemia in rats via ¹H NMR-based metabolomics approach. *Phytother Res* 32(11):2264-2274. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6164>.

[27] Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC (2017) Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *Int J Mol Sci* 18(11). <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18112230>

[28] Ortiz-Avila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba BE et al (2015) Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. *J Diabetes Res*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/485759>

Supplementar Material

Materials and Methods

Avocado oil source

AO was commercially obtained from Stem Pharmaceutical Food Supplements Ltda (CNPJ 04.056.093 / 0001-27) with industry located in Porto Alegre-RS, ANVISA registration number: 04.056.093 / 0001-27, with supplement registered at the Ministry of Health with the number 6.6969.0008.001-4. Its extraction was performed by cold pressing presenting follow chemical-physical characteristics: iode 85 – 90 g I₂/100 g, saponification: 177-198 mg KOH/g, acidity of refined oil: < 0.3% oleic acid; peroxide index: < 10.0 mEq/kg. Fatty-acid composition: oleic acid (C18:1): 0.4-1.0%; linoleic acid (C18:2): 10.0-17.0%; palmitic acid (C16:0): 9.0-18.0%, palminoleic acid (C:16:1): 3.0-9.0; estearic acid (C18:0): 0.5-1.0%.

Chemicals and cells

In vitro cell culture, biochemical and molecular tests were performed using chemical, solvents, cell culture medium and reagents purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, *Missouri*, United States), including HC chemical pure-grade (hidrocortisone 1ng/mL, obtained commercially via Sigma Aldrich,); Vitrocell-Embriolife (Campinas, São

Paulo, Brazil), Gibco-Life Technologies (Carlsbad, California, United States), Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, and Germany), Invitrogen (Carlsbad, California, United States), and Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, United States).

The present study used as *in vitro* experimental model human neuronal cells (SH-SY5Y) obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC CRL-2266) and cultured under standardized laboratorial conditions as previously described by Azzolin et al (2017) [1]. Briefly, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM F12) with 10% foetal bovine serum (FBS) supplemented with 1% penicillin/ streptomycin and amphotericin B were used to cultured neural cells. Cultures were maintained at 37 °C with 5% CO₂ and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. The cell suspension was placed in each well of a 96-well plate (2.5×10^5 cells/well). All experiments were triplicated and performed following 373 OECD Guidance Document on Good *In vitro* Method Practices 374 (2018).[2]

General experimental design

A HC concentration range concentration (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 ng/mL), which potentially trigger cytotoxic effect on neural cells in 24 h cultures was tested here, based in a previous study that showed its inhibitory. AO concentrations tested here (0,2,5,10,20 and 30 µg/mL) were based in Nicollella et al 2017 [3] that did not show genotoxic effect in the *in vitro* and *in vivo* protocols. Both, HC and AO were previously diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO < 5%) until to be added in the culture medium. HC cytotoxic action on SHSY-5Y cells and potential protective AO effect was evaluated in 24 h cultures by two assays: MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) assay and quantification of double-strand DNA fragments in the supernatant medium by fluorescent

PicoGreen® dye. The best AO concentration that could reverse mortality from HC exposure was used for additional testing.

Modulation analysis of stress markers and oxidative metabolism was conducted by quantification of nitric oxide levels, superoxide anion, reactive oxygen species (ROS), lipoperoxidation, protein carbonylation and DNA damage or DNA oxidation by quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Levels of antioxidant enzymes, superoxide dismutase 2 (SOD-2), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) were also determined. Further analysis was also conducted to ascertain whether HC could be inducing apoptosis events that would potentially be reversed by supplementing the cultures with AO. For this, the supernatant levels of caspases (CASP) 1, 3 and 8 by ELISA immunoassay and the gene expression of these CASP and Bcl-2, BAX genes were quantified by qRT-PCR protocols. An additional evaluation of neural cell function was performed by analysis of HC with and without AO supplementation in the Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) also quantified by ELISA immunoassay.

Viability assays

HC neural cells cytotoxicity was determined by MTT assay that quantify living cells using protocol previously described by Azzolin et al (2017) [1]. Briefly, cell culture supernatants were removed, and the cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01 M; pH 7.4). MTT solution (5 mg/mL dissolved in phosphate-buffer solution, PBS) was added to a 96-well plate containing cells with and without HC and AO-exposed and incubated for 1 h at 37°C. Further, the supernatant was again removed, and cells were resuspended in 200µL DMSO, with absorbance read at 560 nm. Second assay estimated mortality in each treatment using the Quant-iT™ dye PicoGreen® dsDNA. This dye is a

fluorescent and stable reagent that presents high dsDNA affinity. Supernatant samples with high dsDNA content indicated high mortality rate, since presence of this molecule indicate death due to cell membrane disruption.

Biochemical assays

ROS levels were determined using dichlorofluorescein diacetate that is able to detect and quantify these molecules, especially hydrogen peroxide using a spectrophotometric protocol [4]. Lipid peroxidation was quantified by reactive substances to thiobarbituric acid spectrophotometric protocol [5]. As oxidative stress trigger protein fragmentation, this process was detected and quantified by analysis of carbonyl compounds production (protein carbonylation) using protocol previously described by Levine et al 1994 [6]. NO levels were quantified by nitrate levels analysis using the Griess reagent [7] and superoxide anion by analysis of the formazan concentration triggered by NBT-reaction [8].

Immunoassay protocols

Immunoassays using to quantify 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), antioxidant enzymes (SOD2, CAT and GPX), CASPs, Bcl-2, BAX, in different SHSY-5Y treatments were performed using Quantikine Human Immunoassay Kit according to manufacturer's instructions.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Gene expression analysis were performed as previously described by Barbisan et al 2014 [9] using total RNA samples extracted with Trizol following manufacturer's instructions. Before analysis RNA extracted was quantified with the Thermo Scientific NanoDrop™

1000 Spectrophotometer. RNA samples were used to perform a reverse transcription, where 1 µg/mL of each sample was added in a reaction mixture containing 0.2 µL DNAase. This reaction was incubated at 37°C for 5 min, followed by heating to 65°C for 10 min. Complementary DNA (cDNA) was produced with 1 µL Iscript cDNA and 4 µL of Mix Iscript. Further, PCR was conducted as follows: 10 min at 5°C, 5 min at 25 °C, 5 min at 85°C, with final incubation for 60 min at 5°C. The qRT-PCR was performed in a Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN biotechnology, Germany) with 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix; the thermocycling conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. A melt curve was generated from 60 °C to 90°C in 0.5°C increments for 5 s at each temperature. All reactions were performed in triplicates, with 1 µM of each primer and 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix; final reaction volume was 20 µL. The specific forward and reverse primer sequences are described used in this study were: SOD2- Forward- 5'GCCCTGGAACCTCACATCAA3' and Reverse- GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT; CAT=Forward-5'GATAGCCTT CGACCCAAGCA 3' and Reverse- ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT; GPX=Forward- 5'GGTTTTTCATCTATGAGGGTGTTTCC3' and Reverse- GCCTTGGTCTGGCAGAGACT; BAX=Forward-5' CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA3' and Reverse- CCCGGAGGAAGTCCAATGT; Bcl-2=Forward-5' GAGGATT GTGGCCTTCTTTGAGT3' and Reverse- AGTCATCCACAGGGCGATGT; CASP3=Forward-5' TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG3' and Reverse- TACCAGT GCGTATGGAGAAATGG; CASP 8=Forward-5' AGGAGCTGCTCTTCCGAATT3' and

Reverse- CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT. The β -actin housekeeping gene was used as an internal control of gene expression analysis. Relative gene expression was calculated using the comparative Ct method and was expressed as fold expression relative to the control.

Statistical analysis

Statistic comparisons were performed using data previously normalized by percentages in relation to the negative control group. This procedure is according procedure broadly used for *in vitro* analysis, allowing for the comparison of data obtained from experiments performed on different days, as preconized in the OECD Guidance Document on Good In vitro Method Practices 374 (2018).[10] Comparisons were performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post-hoc* test. Analysis and graphics showed in the figures were obtained using GraphPad (GraphPad Prism software, version 5.0, 2015). All results with a $p \leq 0.05$ were considered significant.

REFERENCES

- [1] Azzolin VF, Barbisan F, Lenz LS et al (2017) Effects of Pyridostigmine bromide on SH-SY5Y cells: An *in vitro* neuroblastoma neurotoxicity model. *Mutat Res* 823:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.003>
- [2] Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) (2018). [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)19&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)19&doclanguage=en). Accessed 12 April 2018.
- [3] Nicolella HD, Neto FR, Corrêa MB et al (2017) Toxicogenetic study of *Persea americana* fruit pulp oil and its effect on genomic instability. *Food Chem Toxicol* 101:114-120. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.009>.
- [4] Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 42: 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

- [5] Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 20(2):251-256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- [6] Levine RL, Williams JA, Stadtman EP, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233: 346-357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- [7] Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD (2012) The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol* 280(2):164-170. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>
- [8] Morabito Cf, Rovetta F, Bizzarri M et al (2010) Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: a real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med* 48(4):579-589. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.005>
- [9] Barbisan F, Motta Jde R, Trott A et al (2014) Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One* 20:9(10):e107299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107299>

6.DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o potencial efeito do óleo de abacate na exposição crônica ao cortisol utilizando um modelo SHSY-5Y *in vitro*. Inicialmente um protocolo *in vitro* foi estabelecido por exposição ao cortisol em diferentes concentrações. A exposição ao cortisol induziu a mortalidade de neurônios de uma maneira dependente da dose, portanto, esses resultados corroboram evidências anteriores que descrevem efeitos deletérios do alto nível de cortisol nas estruturas cerebrais, que podem contribuir para o processo neurodegenerativo e o desenvolvimento de algumas doenças como o Alzheimer (OUANES E POPP, 2019). Por outro lado, a exposição concomitante ao cortisol e óleo de abacate diminuiu a mortalidade desencadeada pelo cortisol e também modulou marcadores oxidativos, antioxidantes e apoptóticos nessas células.

Como um modelo *in vitro* foi desenvolvido com células SHSY-5Y expostas ao cortisol, é importante fazer algumas considerações a respeito. Essas células são frequentemente usadas como modelos *in vitro* de função e diferenciação neuronal. As células SHSY-5Y apresentam um fenótipo adrenérgico, mas também expressam dopaminérgicos e, por esse motivo, são considerados modelos *in vitro* para a doença de Parkinson (XICOY et al., 2017). A disfunção mitocondrial induzida por alguns produtos químicos é usada para simular *in vitro* distúrbios psiquiátricos como transtorno bipolar e esquizofrenia (KIM et al., 2015). Diferentes análises de neurogênese podem ser realizadas usando essa linhagem celular (KOVALEVICH e LANGFORD, 2013). Além disso, as células SHSY-5Y também foram usadas para testar o efeito de alguns extratos de frutas ou de suas moléculas bioativas isoladas, incluindo laranja (SCOLA et al., 2014), açaí (MACHADO et al., 2016), guaraná (ALGARVE et al., 2019), moringa (CIRMI et al., 2019), entre outros.

No organismo, o cortisol tem uma meia-vida de 60 a 90 minutos, devido ao alto grau de ligação às proteínas plasmáticas que reduz a taxa de depuração plasmocortocóide (HINDMARSH e CHARMANDARI, 2015). Como o cortisol adicionado ao meio de cultura não possui um sistema de depuração tão eficiente, as células permanecem muito mais expostas a esse hormônio. Portanto, consideramos que o procedimento experimental descrito aqui, como um modelo em que a SHSY5Y foi exposta ao cortisol por mais de 24 h, apresenta algumas semelhanças com as condições de estresse crônico *in vivo* nas células dos neurônios.

De fato, nossos resultados mostraram que o cortisol desencadeou aumento na mortalidade a partir da concentração > 0,3 ng/mL, provavelmente induzindo estresse oxidativo e eventos

apoptóticos. Investigações anteriores, também *in vitro* encontraram resultados semelhantes usando a co-cultura de linhas celulares de mioblastos de camundongo (C2C12) e pré-adipócitos (3T3-L1). Após o tratamento com cortisol por três dias, as células aumentaram a expressão de caspases 3 e 8, como observado aqui (MUTHURAMAN, 2014). A morte celular está associada a doenças neurodegenerativas agudas e crônicas que incluem uma perda parcial de neurônios (RADI et al., 2014).

Além disso, a exposição contínua ao cortisol pode induzir o estresse oxidativo (DANDEKAR et al., 2015) e também a morte celular por apoptose (LATT et al., 2018). Existem dois mecanismos principais de apoptose envolvidos na ativação das caspases. A via intrínseca envolve principalmente a detecção de danos no DNA celular, que aumentam o Bax e diminuem os níveis de Bcl-2, induzindo alterações na estrutura mitocondrial. A via extrínseca desencadeia eventos de apoptose mediados por receptores transmembranares (receptores de morte). No entanto, ambas as vias ativam a via apoptótica de execução pela ativação do Casp-8, que posteriormente ativa outras caspases, como o Casp-3. Em nosso estudo, níveis aumentados de proteínas Bax, Bcl-2 e caspases 3 e 8 foram observados em culturas expostas apenas ao cortisol. A superexpressão genética de caspases também foi observada neste tratamento. Esses resultados não permitiram identificar claramente se o cortisol ativou apenas uma das rotas apoptóticas, ou mesmo as duas. No entanto, não deixou dúvidas de que a morte causada por células neuronais envolvia aumento do estresse oxidativo, possível dano ao DNA e indução de apoptose. Níveis especialmente elevados de proteína da caspase 3 indicam que a exposição contínua ao cortisol induz disfunções importantes, muitas delas associadas ao envelhecimento cerebral e ao desenvolvimento de doenças como a doença de Alzheimer. Por exemplo, no cérebro envelhecido, a ativação do Casp-3 é um ponto de convergência comum para vários gatilhos tóxicos, como danos oxidativos (SNIGDHA et al., 2012). Esses resultados reforçaram a idéia de que o modelo de exposição crônica das células SHSY-5Y ao cortisol é válido e poderia ser usado para avaliar o impacto protetor de vários tipos de alimentos e suas moléculas bioativas.

Esse tipo de modelo experimental *in vitro* pode ser considerado relevante, uma vez que o estresse psicossocial crônico é uma condição muito comum no mundo contemporâneo. A maior parte da resposta é mediada pelo eixo HPA hormonal de maior estresse. No SNC, acredita-se que o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal como parte do sistema límbico apresentem papéis cruciais na regulação do eixo HPA (PRUESSNER et al., 2010; YIALLOURIS et al., 2019).

Como o cortisol tem capacidade de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica que chega aos neurônios e células da glia (SWATI e MANZOOR., 2007), a maior exposição do CNS ao cortisol é direta e rápida. Em termos adaptativos, assume-se que a resposta a um estressor particular é agudo e altamente resolúvel, geralmente envolvendo elementos de luta ou fuga. Portanto, a exposição crônica ao estresse que induz altos níveis sustentados de cortisol no corpo é altamente prejudicial. Conforme comentado pela revisão de Russel e Lightman (2019), a exposição a longo prazo ao cortisol se tornou inadequada, tendo sido associada ao desenvolvimento de síndrome metabólica, obesidade, câncer, distúrbios de saúde mental, doenças cardiovasculares e aumento da suscetibilidade a infecções. O estresse psicossocial crônico não pode ser evitado em muitas situações, pois pode envolver família, trabalho ou outra atividade social contínua. Nesse sentido, estratégias que atenuam os efeitos deletérios do estresse são de grande relevância. Entre esses, o uso de componentes da dieta é um fator que pode auxiliar esse processo, incluindo o uso de AO.

Estudos conduzidos por Zarrabal e colaboradores (2014), apresentaram indícios de que processos inflamatórios foram parcialmente revertidos e mostrou uma redução nos níveis de triglicerídeos, VLDL, LDL, sem afetar os níveis de HDL. Após a administração de óleo de abacate durante 4 semanas em ratos com alterações metabólicas induzidas pela ingestão de sacarose

Assim como Salgado e colaboradores (2008), sugeriram em um estudo experimental em animais, que o óleo de abacate poderia controlar dislipidemias através de seus fitonutrientes, como os sitosteróis, presentes no óleo de abacate, devido a sua estrutura ser muito similar a do colesterol e por seu mecanismo de ação que envolve a inibição intestinal de absorção do colesterol e diminuição da síntese de colesterol hepático

Nossos resultados mostraram importante ação neuroprotetora da AO, revertendo as taxas de mortalidade induzidas e também diminuindo os eventos de estresse oxidativo e apoptose induzidos pela exposição ao cortisol. De acordo com alguns estudos, o AO é rico em β -sitosterol e ácido oleico, uma gordura insaturada usada como adjuvante no tratamento de hiperlipidemias (TAN et al., 2018).

Estudos conduzidos por Avila, 2015, mostraram que o óleo de abacate, melhorou a função mitocondrial do cérebro, evitando o comprometimento da respiração mitocondrial e potencial transmembrana induzida por diabetes, além de aumentar a atividade do complexo III. Efeitos estes que podem estar relacionados com a diminuição do estresse oxidativo, através da redução dos

níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e melhoria do estado redox, efeitos que podem retardar o aparecimento de encefalopatia diabética.

Além disso, lembra muito o azeite porque é extraída da polpa e a semelhança de suas propriedades principalmente devido à composição de seus ácidos graxos, predominando em ambos os ácidos oleico (FLORES et al., 2019). No entanto, ao contrário do azeite que tem sido extensivamente estudado por suas propriedades neuroprotetoras (ANGELONI et al., 2017), investigações sobre os efeitos da AO na função neural ainda são bastante incipientes (ORTIZ-AVILA et al., 2015; DE MELLO et al; 2019; NAM et al., 2019).

7.CONCLUSÃO

A partir da realização das análises aqui propostas os resultados indicaram que:

- óleo de abacate apresenta capacidade antioxidante em todas as concentrações testadas. Ainda, não causou morte neuronal nas concentrações testadas, por sua vez, o cortisol teve efeito concentração dependente, nas maiores concentrações houve maior queda de viabilidade, ou seja induziu morte celular;

- quando as células foram expostas ao cortisol e tratadas com óleo de abacate de forma concomitante a viabilidade celular, os marcadores oxidativos e apoptóticos foram revertidos a níveis significativamente menores em relação aquelas tratadas apenas com cortisol. Ainda, o tratamento teve efeitos positivos aumentando os níveis do BDNF.

Portanto, apesar das restrições metodológicas associadas ao protocolo *in vitro*, os resultados apresentados aqui em conjunto com essas investigações sugerem que óleo de abacate poderia ter propriedades neuroprotetoras relevantes, incluindo atenuação de alterações desencadeadas por estresse psicossocial que induzem alterações neurais crônicas pela exposição contínua ao cortisol. Assim o óleo de abacate poderia ser utilizado na prevenção de modificações fisiopatológicas e nas manifestações clínicas que caracterizam o processo de envelhecimento. Estudos em ambiente controlados com animais e seres humanos precisam ser realizados para extrapolação desta hipótese a uma amostra de indivíduos, levando em consideração os processos fisiológicos e bioquímicos do organismo.

8. REFERÊNCIAS

ACABCHUK R.L. et al; **Stress and chronic illness: The inflammatory pathway.** Soc Sci Med. v.185, p.166-170, 2017. doi: 10.1016/j.socscimed.2017.04.039.

ALGARVE T.D. et al; **Guarana improves behavior and inflammatory alterations triggered by methylmercury exposure: an in vivo fruit fly and in vitro neural cells study.** *Environ Sci Pollut Res Int.* May; v.26, n.15, p.15069-15083, 2019. doi: 10.1007/s11356-019-04881-0.

AMEER K., **Avocado as a Major Dietary Source of Antioxidants and Its Preventive Role in Neurodegenerative Diseases.** *Adv Neurobiol.* v.12, p.337-354, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-28383-8_18.

ANGELONI C, MALAGUTI M, BARBALACE MC. **Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection.** *Int J Mol Sci.* v.18, n 11, pii: E2230. 2017. doi: 10.3390/ijms18112230.

ARSENIS, N.C. et al. **“Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action.”** *Oncotarget,* v.8, n27, p. 45008-45019, 2017. doi:10.18632/oncotarget.16726

ASCHBACHER K., et al, **Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity.** *Psychoneuroendocrinology.* Sep, v. 38, n.9, p.1698-1708, 2013. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.02.004. Epub Mar 13, 2013.

AVILA, O.O. et al. **Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats.** *Journal of Diabetes Research,* v. 2015, 2015. doi: 10.1155/2015/485759.

AZUMA K., et al., **Chronic Psychological Stress as a Risk Factor of Osteoporosis.** *Journal of UOEH.* v.37, p. 245-253, 2015. doi: <https://doi.org/10.7888/juoeh.37.245>

BAUER M. e TEIXEIRA A.L., **Inflammation in psychiatric disorders: what comes first?: Inflammation in psychiatric disorders.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* v. 1437, n. 1, p. 57-67, 2018 doi: 10.1111 / nyas.13712.

BELLAMY D. **The Subject of Gerontology.** In: BELLAMY D. *Ageing: a biomedical perspective.* Chichester: Wiley, p.1-35, 1995.

BERCIK P, COLLINS SM, VERDU EF. **Microbes and the gut-brain axis.** *Neurogastroenterol Motil ;* v. 24, n.5, p. 405–413, 2012. doi: 10.1111 / j.1365-2982.2012.01906.x.

BIN J.M. et al; **Complete Loss of Netrin-1 Results in Embryonic Lethality and Severe Axon Guidance Defects without Increased Neural Cell Death.** *Cell Reports,* v.12, p.1099–1106, 2015. doi: 10.1016 / j.celrep.2015.07.028.

BLESSMANN E. J., **Corporeidade e Envelhecimento: O significado do corpo na velhice.** Estud. interdiscip. envelhec., Porto Alegre, v. 6, p. 21-39, 2004.

CANHADA S.L. **A suplementação de ômega 3 na doença de Alzheimer: uma revisão sistemática.** p.43. Trabalho de Conclusão de Curso (bacharel em Nutrição). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2015.

CARC L, **Aspectos estruturais e funcionais do complex telômero/telomerase.** Mestrado integrado em ciências farmacêuticas. Universidade Fernando pessoa. Faculdade de ciências da saúde. Porto, 2015.

CHIRIAC V.F. et al., **Psychological stress and breast cancer incidence: a systematic review.** Clujul Medical. v. 91, n. 1, p. 18-26, 2018. doi: 10.15386/cjmed-924.

CHOUDHARY V. et al, **The topology of the triacylglycerol synthesizing enzyme Lro1 indicates that neutral lipids can be produced within the luminal compartment of the endoplasmic reticulum: Implications for the biogenesis of lipid droplets.** Commun Integr Biol. v.4, n.6, p. 781-784, 2011. doi: 10.4161/cib.17830.

CIRMI S, et al, **Moringin from Moringa Oleifera Seeds Inhibits Growth, Arrests Cell-Cycle, and Induces Apoptosis of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells through the Modulation of NF- κ B and Apoptotic Related Factors.** *Int J Mol Sci.* 2019 Apr, v.20, n.8, p. 1930, 2019. doi: 10.3390/ijms20081930

CRUZ, I. B. M. **Genetics of aging and its impact on human longevity: theories and evidences that helps to prevent age-associated diseases.** Pan American Journal of Aging Research. v. 2, n.1, p. 3-14, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.15448/2357-9641.2014.1.20082>.

CZARNY P. et al, **Impact of single nucleotide polymorphisms os base excision repair genes on DNA damage and efficiency of DNA repair in recurrent depression disorder.** Molecular Neurobiology. v.54, p. 4150-4159, 2017. doi: 10.1007 / s12035-016-9971-6.

DAIUTO et al; **Postharvest of 'Hass' avocados submitted to UV-C radiation.** Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. v.7. p.149-160, 2013.

DANDEKAR A, MENDEZ R, ZHANG K. **Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease.** Methods Mol Biol. v. 1292, p. 205-214, 2015. doi: 10.1007/978-1-4939-2522-3_15

DE MELO MFFT, et al, **Maternal Supplementation With Avocado (Persea americana Mill.) Pulp and Oil Alters Reflex Maturation, Physical Development, and Offspring Memory in Rats.** Front Neurosci. v. 23; p.13:19, 2019. doi: 10.3389 / fnins.2019.00009.

DELL'OSSO, M. C. et al. **Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: A new avenue for antidepressant development?** Current. Medic. Chem.v. 18, p. 245-255, 2011. doi: 10.2174 / 092986711794088353.

DEPINHO RA , K. POLYAK; **Cromossomos de câncer em crise.** Nat Genet ,v. 36, p. 932 - 934, 2004. doi: 10.1038 / ng0904-932.

DIÁCONO G , CHALEIRA C , HAYES D **Omega 3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of depression.**Crit Rev Food Sci Nutr. 2 de janeiro; v. 57, n.1, p. 212-223, 2017. doi: 10.1080 / 10408398.2013.876959.

DU J, ZHU M, BAO H **The Role of Nutrients in Protecting Mitochondrial Function and Neurotransmitter Signaling: Implications for the Treatment of Depression, PTSD, and Suicidal Behaviors** Crit Rev Food Sci Nutr.v. 56, n.15, p. 2560-2578, 2016. doi: 10.1080 / 10408398.2013.876960

DU J.et al, **Microbiota-Dependent Induction of Colonic Cyp27b1 Is Associated With Colonic Inflammation: Implications of Locally Produced 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Inflammatory Regulation in the Colon.** Endocrinology, November 2017, v. 158, n.11, p. 4064–4075, 2017 doi:10.1210/en.2017-00578

EMBRAPA, **Reguladores vegetais no manejo da produção e qualidade de abacate no Semiárido brasileiro.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1012747/reguladores-vegetais-no-manejo-da-producao-e-qualidade-de-abacate-no-semiarido-brasileiro>

EPEL E.S. et al; **Accelerated telomere shortening in response to life stress.** Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 2004, v.101, n.49, p.17312-17315. 2004. doi: 10.1073/pnas.0407162101.

EPEL E.S. **Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging?**Hormones (Athens). Jan-Mar; v.8, n.1, p.7-22, 2009. doi: <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1217>.

FERRAZ AC, et al. **Chronic w-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol.** Behav Brain Res. v.219, n.1, p.116-122, 2011. doi: 10.1016 / j.bbr.2010.12.028.

FERREIRA M et al **OXPHOS: Déficit do Complexo I. Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déficit do Complexo I.** Cadeia Respiratória Mitocondrial. ISSN 0871-3413 • Laboratório de Investigação, Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, INSA. ©ArquiMed, 2008

FLORES M. et al, **Avocado Oil: Characteristics, Properties, and Applications.** Molecules. 2019 Jun 10; v.24, n.11. pii: E2172, 2019. doi: 10.3390/molecules24112172

FORLENZA M.J., MILLER G.E..**Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression.** Psychosom Med. 2006 Jan-Feb; v. 68, n.1, p. 1-7, 2006. doi: 10.1097 / 01.psy.0000195780.37277.2a.

FREEMAN J.T.; et al.; **Surgical site infections following bariatric surgery in community hospitals: a weighty concern?** *Obes Surg.*v.21, n.7, p.836-840, 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s11695-010-0105-3>.

FREITAS, E. V. et al, **Demografia e epidemiologia do envelhecimento**. Em: L. Py, J. L.Pacheco & S. N Goldman. *Tempo de envelhecer: percursos e dimensões psicossociais*. p. 19-38. Rio de Janeiro: Nova Editora, 2004.

GIDRON Y.; et al. **The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical review**. *Biol Psychol.* v. 72; p. 291–304; 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2005.11.011>.

GIL A., GIL F.; **Fish, a Mediterranean source of n-3 PUFA: benefits do not justify limiting consumption**. *Br J Nutr.* v. 2; p.58-67; 2015. doi: [10.1017/S0007114514003742](https://doi.org/10.1017/S0007114514003742).

GONG X., et al., **Revision of the Chinese facial affective picture system**. *Chin. J. Ment. Health*,v. 25, p. 40–46, 2011.

GOUIN et al., **Immune Dysregulation and Chronic Stress Among Older Adults: A Review**.*NeuroImmunoModulation*, v.15, n.4-6, p. 251-259, 2008. doi: <https://doi.org/10.1159/000156468>.

GRIFFITH JD, et al. **Os telômeros de mamíferos terminam em um grande loop duplex** *Celular* ,97, p. 503 - 514, 1999. doi: [10.1016 / s0092-8674 \(00\) 80760-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80760-6).

HALLIWELL B., **Biochemistry of oxidative stress**. *Biochem Soc Trans.* v.35 (Pt 5), p. 1147-1150, 2007. doi: [10.1042/BST0351147](https://doi.org/10.1042/BST0351147).

HALLIWELL B. & WHITEMAN M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** *British Journal of Pharmacology.* v. 142, p. 231–255; 2004. doi: [10.1038 / sj.bjp.0705776](https://doi.org/10.1038 / sj.bjp.0705776).

HARLEY CB, **Telomere: relógio mitótico ou bomba-relógio genético?** *Mutat Res* , v.256 , p.271 - 282, 1991.

HAYFLICK, LEONARD AND MOORHEAD, PAUL S. **"The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains."** *Experimental Cell Research* v. 25, p. 585–621, 1961.

HINDMARSH PC, CHARMANDARI E, **Variation in absorption and half-life of hydrocortisone influence plasma cortisol concentrations**, *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 82, n.4, p.557-561, 2015. doi: [10.1111/cen.12653](https://doi.org/10.1111/cen.12653).

HUMPHREYS J.; et al. **Telomere shortening in formerly abused and never abused women**. *Biol Res Nurs.* v.14; p.115–123; 2012. doi: <https://doi.org/10.1177/1099800411398479>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Envelhecimento da população. 2016.** <Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br/noticias/censo.html?busca=1&id=1&idnoticia=2032&t=2010-esperanca-vida-nascer-era-73-48-anos&view=noticia> > Acesso em: 14 dezembro., 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Envelhecimento da população. 2017.** <Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br/noticias/censo.html?busca=1&id=1&idnoticia=2032&t=2010-esperanca-vida-nascer-era-73-48-anos&view=noticia> > Acesso em: 15 dezembro., 2019.

IRIE, K.; et al., **Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee.** *Knee*, v. 10, p. 6-93. 2003. doi: [https://doi.org/10.1016/S0968-0160\(02\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0160(02)00083-2)

JENTZSCH, A.M., et al; **Improved analysis human of malondialdehyde in body fluids.** *Free Radical Biology & Medicine*. v. 20, n. 2, p. 251-256, 1996 .doi: 10.1016 / 0891-5849 (95) 02043-8.

JORGENSEN A, et al, **A chronic increase of corticosterone age-dependently reduces systemic DNA damage from oxidation in rats.** *Free Radic Biol Med*. 2017 Mar; v.104, p. 64-74. 2017. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.013. Epub 2017 Jan 7.

KANG J. X.e WEYLANDT, K.H. **Modulation of Inflammatory Cytokines by Omega-3 Fatty Acids.** *Lipids inHealth and Disease*, v. 49, p 133-143, 2008. doi: 10.1007 / 978-1-4020-8831-5_5

KIVIMÄKI M. et al. **Work stress and risk of death in men and women with and without cardiometabolic disease: a multicohort study.** *Lancet Diabetes Endocrinol*. v. 6, p. 705-713, 2018. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30140-2.

KHURANA et al., **Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging.***Nutrients* , v.5, p. 3780, 2013. doi: 10.3390 / nu5103779.

KIM HK et al; **The link between mitochondrial complex I and brain-derived neurotrophic factor in SH-SY5Y cells--The potential of JNX1001 as a therapeutic agent.** *Eur J Pharmacol*. v.764, p.379-384, 2015. doi: 10.1016 / j.ejphar.2015.07.013.

KOSINSKA et al, **Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of Persea Americana Mill Peels and seeds of two varieties** *J. Agric. Food Chem*. 2012,v.60, n.18, p. 4613-4619 Publication Date:April 11, 2012 <https://doi.org/10.1021/jf300090p>.

KOVALEVICH J¹, LANGFORD D., **Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology.** *Methods Mol Biol*. v.1078, p.9-21, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2

LARRIEU et al., **Nutritional Omega-3 Deficiency Alters Glucocorticoid Receptor-Signaling Pathway and Neuronal Morphology in Regionally Distinct Brain Structures Associated with Emotional Deficits**. *Neural Plasticity*, v. 2016, Article ID 8574830, p. 9 pages, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8574830>.

LATT HM, et al, **Oxytocin Inhibits Corticosterone-induced Apoptosis in Primary Hippocampal Neurons**. *Neuroscience*. May; v.379, p.383-389, 2018. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.03.025.

LAWRENCE D., KISELY S., PAIS J. **The epidemiology of excess mortality in people with mental illness**. *Can. J. Psychiatry*. v.55; p.752–760, 2010. doi: 0.1177/070674371005501202.

LEMGRUBER, R.; **12 alimentos para combater a depressão**. *Minha Vida*. 2013. Disponível em: <https://www.minhavidade.com.br/alimentacao/listas/13084-12-alimentos-para-combater-a-depressao-e-melhorar-o-humor>. Acesso em: 14 abril 2019.

LEVINE, R.L.; **Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins**. *Methods. Enzymol.*, v.233, p.346-357, 1994.doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

LU et al., **Achieving Reactive Species Specificity within Plasma Activated Water through Selective Generation using Air Spark and Glow Discharges**. *Plasma Processes and Polymers*. v.14, n.8,e1600207, 2017. doi: 10.1002 / ppap.201600207.

MA H. et al., **Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos**. *Nature*, v.548, p. 413–419, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature23305>.

MACHADO, A.K. et al. **Efeito cito-genômico do peróxido de hidrogênio e do guaraná (Paullinia cupana) em células tronco mesenquimais**. 2014.95p. Dissertação (mestrado em Farmacologia)Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

MACHADO AK, et al **Neuroprotective Effects of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In Vitro* Exposure**, *Oxid Med Cell Longev*. v.2016, Article ID 8940850, 14 pages.2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8940850>.

MASSAFERA, G.; COSTA, T.M.B.; OLIVEIRA, J.E.D. **Composição de ácidos graxos do óleo do mesocarpo e da semente de cultivares de abacate (*Persea Americana*, MILL.) da Região de Ribeirão Preto. São Paulo, 2010**. Disponível em: < <http://servbib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/940/a20v21n2.pdf>>. Acesso em: 04 dez 2019.

MCCLINTOCK B.; **O significado das respostas do genoma para desafiar**; *Science* ,v. 226 , p. 792- 801; 1984.

MELGAREJO, et al. **Experimentos em fisiologia vegetal**. Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá. 2010.ISBN 9789587196689.

MIN KB , MIN JY **Association between leukocyte telomere length and serum carotenoid in US adults.** Eur J Nutr. v. 56, n.3, p.1045-1052, 2017. doi: 10.1007 / s00394-016-1152-x.

MORABITO C. et al..**Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach.** Free Radical Biology & Medicine; v.48; p. 579–589; 2010. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.005.

MUTHURAMAN, P, **Effect of Cortisol on Caspases in the Co-cultured C2C12 and 3 T3-L1 Cells.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 173, n.4, p.980–988. doi:10.1007/s12010-014-0909-z, 2014.

NAM YH, et al, **Avocado Oil Extract Modulates Auditory Hair Cell Function through the Regulation of Amino Acid Biosynthesis Genes.** Nutrients. 2019 Jan 8, v.11, n.1. pii: E113, 2019. doi: 10.3390/nu11010113.2019.

NEEDHAM J.M., NICHOLAS S.K.,DAVIS C.M., **Food allergies developing after solid organ transplant.** Review Article. Pediatr Transplantation. v. 19, p. 827–835. 2015. doi: 10.1111 / petr.12613.

OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015), **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024**, OECD Publishing, Paris. doi: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en disponível em:<http://www.fao.org/3/a-i4738e.pdf>. acesso em 11 de abril de 2019.

OBOH et al; **Interaction of Some Commercial Teas with Some Carbohydrate Metabolizing Enzymes Linked with Type-2 Diabetes: A Dietary Intervention in the Prevention of Type-2 Diabetes.** Advances in preventive medicine. 2014. doi: 10.1155/2014/534082.

OLOVNIKOV AM; **Princípio de marginotomia na síntese de modelos de polinucleotídeos.** Dokl Akad Nauk Sssr + , v. 201 , p. 1496 - 1498; 1976.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). DESA/Population Division, World Population Prospects, 2018.Disponível em:<<https://esa.un.org/unpd/wpp/dataquery/>>Acesso em: 30 mar., 2018.

ORTIZ-AVILA O. et al, **Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats.** J Diabetes Res. v. 2015; ID 48575, p.9. Published online 2015 Jun 9. doi: 10.1155/2015/485759, 2015.

ORTIZ-AVILA O. et al,**Avocado oil induces long-term alleviation of oxidative damage in kidney mitochondria from type 2 diabetic rats by improving glutathione status.**J Bioenerg Biomembr. 2017 Apr, v. 49, n.2, p. 205-214, 2017. doi: 10.1007/s10863-017-9697-9.

OUANES S, POPP J, **High Cortisol and the Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Review of the Literature**, *Front Aging Neurosci.* v. 1, p.11-43, 2019. doi: 10.3389/fnagi.2019.00043.

PAYNE, P., et al, **Somatic Experiencing: Using interoception and proprioception as core elements of trauma therapy**. *Front. Psychol.* v. 6, p.93, 2015. doi:10.3389/fpsyg.2015.00093

PEREIRA, P. A. P. et al, **Mudanças estruturais, política social e papel da família: crítica ao pluralismo de bem-estar**. In: PEREIRA, P. A. P. Política social, família e juventude: uma questão de direitos. São Paulo: Cortez, p.25-42, 2004.

PHILLIPS A.C.; et al. **Os sintomas de depressão predizem o comprimento dos telômeros? Evidências do oeste da Escócia vinte e sete estudos**. *Psychosom Med.* v. 75, n.3, p.288-296, 2013.

PICARD C. et al; **Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015**. *J Clin Immunol.* 2015 Nov; v.35, n.8, p. 696-726, 2015. doi: 10.1007/s10875-015-0201-1

PRASAD K.N., WU M, BONDY SC **Telomere shortening during aging: Attenuation by antioxidants and anti-inflammatory agents**. *Mech Ageing Dev.* v. 164 p. 61-66, 2017. doi: 10.1016/j.mad.2017.04.004

PRUESSNER JC, et al **Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations** - 2008 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*, v.35, n.1, p.179-191, 2010.

PUSCEDDU M.M. et al, **N-3 Polyunsaturated Fatty Acids through the Lifespan: Implication for Psychopathology** *International Journal of neuropsychopharmacology*, v. 19, n. 12, p.78,2016. doi: doi.org/10.1093/ijnp/pyw078

QUIJJE et al., **Updates in the neuroendocrinology of stress and its clinical management**. *Current Opinion in Endocrinology, diabetes e obesity, London.* v.22, n. 4, p. 319-324, 2015. doi: 10.1097/MED.0000000000000212.

RADIE, et al, **Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases**. *J Alzheimers Dis* ; v.42, n 3, p. S125-S152, 2014. doi: 10.3233 / JAD-132738.

RAO J.S. et al., **n-3 Polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF viaa p38 MAPK-dependent mechanism**. *Molecular Psychiatry* v.12, p.36-46, 2007. doi: 10.1038 / sj.mp.4001888 .

RICE-EVANS C. et al **Antioxidant properties of phenolic compounds**. *Trends in Plant Science.* April, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997. doi: https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2

RIDOUT K.K. et al. **The Cellular Sequelae of Early Stress: Focus on Aging and Mitochondria.** *Neuropsychopharmacology*. Jan; v. 41, n.1, p. 388–389, 2015. Published online 2015 Dec 10. doi: 10.1038/npp.301. 2015.

RUSSELL G, LIGHTMAN S. **The human stress response.** *Nat Rev Endocrinol*, Sep; v.15, n.9, p. 525-534, 2019. doi: 10.1038 / s41574-019-0228-0.

SALGADO JM, et al. **Efeito do abacate (Persea americana Mill) variedade hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos.** *Ciênc Tecnol Aliment*, Campinas; v.28, n.4, p.922-928,2008. ISSN 0101-2061.

SANTOS E. G, SIQUEIRA M. M., **Prevalência dos transtornos mentais na população adulta brasileira: uma revisão sistemática de 1997 a 2009.** *J Bras Psiquiatr*. v. 59, n.3 p.238-246, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0047-20852010000300011>

SCHEIDT L., et al, **Ethanol during adolescence decreased the BDNF levels in the hippocampus in adult male Wistar rats, but did not alter aggressive and anxiety-like behaviors.** *Trends Psychiatry Psychother*. v.37, n.3 Porto Alegre, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2237-6089-2015-0017>.

SCOLA G, et al, **Vitis labrusca extract effects on cellular dynamics and redox modulations in a SH-SY5Y neuronal cell model: a similar role to lithium.** *Neurochem Int*. Dec; v.79, p.12-19, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.002>

SHAY, J. W., WRIGHT, W.E, **Hayflick, his limit and cellular ageing.** *Nature reviews Molecular cell Biology*, v. 1, n. 1, p. 72-76, 2000. ISSN 1471-0080.

SILVA, W. J. M., FERRARI, C. K. B. **Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento.** *Rev. bras. geriatr. gerontol.* [online]. 2011, v.14, n.3, pp.441-451. ISSN 1981-2256. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1809-98232011000300005>, 2011.

SINHA R, JASTREBOFF AM. **Stress as a common risk factor for obesity and addiction.** *Biol Psychiatry*. v. 73, n.9, p. 827-835, 2013. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.01.032.

SMITH KM, et al; **Relationship between fish intake, n-3 fatty acids, mercury and risk markers of CHD** (National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002). *Public Health Nutr*. Aug; v.12, n.8, p.1261-1269, 2009. doi: 10.1017/S1368980008003844.

SNIGDHA S, et al, **Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death.** *Neurosci Bull*. v.28, n.1, p.14-24, 2012. doi: 10.1007/s12264-012-1057-5.

SOARES, H.F.; ITO, M.K. **The monounsaturated fatty acid from avocado in the control of dyslipidemia.** *Revista Ciências Médicas*, v.9, n.2, p.47-51, 2000. Available from: <Available from:<http://periodicos.puccampinas.edu.br/seer/index.php/cienciasmedicas/article/viewFile/1330/1304>>. Acesso: 23 de Dez., 2019.

SONG H, et al. **Association of Stress-Related Disorders With Subsequent Autoimmune Disease.** JAMA. v. 319, n.23, p.2388–2400, 2018. doi:10.1001/jama.2018.7028

SQUASSINA A., PISANU C., AND VANNI R. **Mood Disorders, Accelerated Aging, and Inflammation: Is the Link Hidden in Telomeres?** Cells; ;v.8, n.1, p. 52. 2019. Published online jan 2019. doi: 10.3390/cells8010052

STANISLAV Ď.; **Theory of reliability, biological systems and aging.** Mechanisms of Ageing and Development. v. 18,n. 4, p. 339-353; 1982.

STEPTOE, A. AND KIVIMAKI, M. **Stress and Cardiovascular Disease.** Nature Reviews Cardiology, v.9, p. 360-370, 2012. disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio>

STEPTOE A, et al **The Longitudinal Relationship Between Cortisol Responses to Mental Stress and Leukocyte Telomere Attrition.** J Clin Endocrinol Metab. Mar 1; v.102, n.3, p.962-969.2017. doi: 10.1210/jc.2016-3035

STINDL R., **Defining the steps that lead to cancer: Replicative telomere erosion, aneuploidy and an epigenetic maturation arrest of tissue stem cells,** Medical Hypotheses; v. 71, n. 1, p.ages 126-140, 2008. doi: 10.1016 / j.mehy.2008.01.010.

STOJANOVICH L **Stress and autoimmunity.** Autoimmun Rev.Mar; v.9, n.5, p. A271-A276, 2010. doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.014. Epub 2009 Nov 27.2010.

STRAUB R.H., CUTOLO M..**Glucocorticoids and chronic inflammation.**Rheumatology, v 55, n.2, p. ii6–ii14,2016. doi:10.1093 / reumatologia / kew348.

SU, Y., et al, **Characterization of a Drosophila proximal-sequence-element-binding protein involved in transcription of small nuclear RNA genes.** Europ. J. Biochem. v. 248, n.1, p. 231-237.1997. doi: 10.1111 / j.1432-1033.1997.t01-1-00231.x

SWATI BANERJEE AND MANZOOR A, **Bhat Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation.** , 2007. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094345

TACO, **Tabela Brasileira de Composição dos alimentos.**Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA/Unicamp), 2016. Disponível em: <http://www.nepa.unicamp.br/noticias/24/taco>. Acesso em: 29 de dez de 2019.

TABESHPOUR J., **Effects of Avocado (*Persea americana*) on Metabolic Syndrome: A Comprehensive Systematic Review.** Phytoterapy Research.v.31, n.6, p. 819-837, 2017. doi:10.1002 / ptr.5805.

TAN CX, et al, **Effect of virgin avocado oil on diet-induced hypercholesterolemia in rats via ¹H NMR-based metabolomics approach.**Phytother Res. v. 32, n.11, p. 2264-2274, 2018. doi:10.1002 / ptr.6164.

TANGO, J.S. et al. **Physical and chemical characterization of avocado fruits aiming its potential for oil extraction.** Revista Brasileira de Fruticultura, v.26, n.1, p.17-23, 2004. Available from: <Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v26n1/a07v26n1> >. Accessed: Dec. 22, 2019. doi: 10.1590/s0100-29452004000100007.

TEIXEIRA, I.N.D.O, GUARIENTO, M.E., **Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 15, n.6, p. 2845-2857, 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000600022>.

TONINI, C.L., **Aterosclerose E Envelhecimento – Efeitos Do Estresse Oxidativo Em Células De Medula Óssea, Sangue E Aorta,** Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

VERHOEVEN J.E.; et al. **Transtorno depressivo maior e envelhecimento celular acelerado: resultados de um grande estudo de coorte psiquiátrica.** Psiquiatria Mol. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0047-20852009000300006>.

VICARIO M, et al. **Crhonicpsychological stress induces reservible mitochondrial damage and corticotropin-releasing factor type 1 upregulation in the rat intestine and IBS-like gut dysfunction.** Psychoneuroendocrinology; v. 37, p.65-77, 2012.

VIZZOTTO, E. **Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos,** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. 10p.

WALKER E.R., MCGEE R.E., DRUSS B.G. **Mortality in mental disorders and global disease burden implications: A systematic review and meta-analysis.** JAMA Psychiatry.;v.72; p.334– 341;2015. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2502.

WANG Y, et al. **Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery.** Mol Biol Cell, v. 23, n.19, p. 3911-3922, 2012. doi: 10.1091/mbc.E12-05-0396.

WU H. et al., **Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites.** Science. v. 361, n. 6401, p.5835, 2018. doi: 10.1126 / science.aan5835.



XICOY H, WIERINGA B, MARTENS GJ. **The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review.** Mol Neurodegener. Jan 24, v.12, n.1, p.10, 2017. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0

YIALLOURIS A., et al, **Adrenal Aging and Its Implications on Stress Responsiveness in Humans.** Front Endocrinol (Lausanne).Feb v.7, p.10:54, 2019. doi: 10.3389/fendo.2019.00054. eCollection.

ZARRABAL, O.C. et al. **Avocado Oil Supplementation Modifies Cardiovascular Risk Profile Markers in a Rat Model of Sucrose-Induced Metabolic Changes.** Disease Markers, v.2014,p.386425, 2014. doi: 10.1155 / 2014/386425.

ZHANG J., et al; **Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation** Ageing Research Reviews v. 25, p..55-69, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26616852>. Acesso: 30 de junho de 2019 as 22hrs e 6 min. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.11.006>.

ANEXO A- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

PLANT FOODS FOR HUMAN NUTRITION  

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

Role: **Author** Username: fernandabarbisan@gmail.com

Submissions Being Processed for Author Fernanda Barbisan

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	QUAL-D-19-00813	Avocado oil (Persea americana) protects neural cells against oxidative stress and apoptosis induction triggered by cortisol	14 Dec 2019	14 Dec 2019	New Submission

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu