



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

AURIANA SERRA VASCONCELOS MALLMANN

**RIPARINA III É UMA DROGA PROMISSORA NO TRATAMENTO DA
DEPRESSÃO?**

FORTALEZA

2019

AURIANA SERRA VASCONCELOS MALLMANN

RIPARINA III É UMA DROGA PROMISSORA NO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO?

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M219r Mallmann, Auriana Serra Vasconcelos.
Riparina III é uma substância promissora no tratamento da depressão? / Auriana Serra Vasconcelos
Mallmann. – 2019.
90 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

1. Depressão. 2. Corticosterona. 3. Riparina. 4. Estresse oxidativo. 5. Citocinas. I. Título.

CDD 615.1

AURIANA SERRA VASCONCELOS MALLMANN

RIPARINA III É UMA DROGA PROMISSORA NO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO?

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Micheline Soares Costa Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Andrea Felinto Moura
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

À Deus e a minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

Muitos perguntam sobre como consigo fazer tantas coisas. Acredito que ninguém cresce sozinho e todo trabalho é fruto da colaboração de várias pessoas. Para esta tese, além da minha dedicação pessoal, pude contar com várias pessoas. À todas elas, deixo da minha gratidão.

Agradeço a Deus, sempre em primeiro lugar, por ter permitido mais uma tão sonhada conquista. A Ele, toda honra e toda glória sejam dadas sempre.

À minha mãe, a pessoa mais importante da minha vida e a minha primeira inspiração como professora. Obrigada por amar a mim e aos meus irmãos incondicionalmente. Obrigada por todos os valores que aprendi com você. Obrigada por não ter medido esforços para que nós tivéssemos o que havia de melhor em educação. Obrigada por me mostrar o caminho do conhecimento. Se hoje estou aqui, é porque ouvi os seus ensinamentos! Você é a minha maior inspiração em todas as áreas da vida, a minha mulher maravilha!

Ao meu pai, Pedro Aury, a minha maior saudade! Hoje não tenho sua presença física, mas tenho a do coração. Obrigada por você ser meu maior exemplo de humildade, honestidade e integridade, tenho muito orgulho de ouvir de todos o quanto nos parecemos interna e externamente. Sei que você ficaria orgulhoso de saber que sua filha mais velha escolheu a mesma profissão de seu pai. Hoje estou realizando um sonho que sei que também seria seu e só consegui por tenho você dentro de mim.

Aos meus irmãos, Alicia e Pedro, que são meus companheiros de vida. Todos sabem do grande amor e cuidado que dedico aos meus irmãos. Agradeço por todo apoio e por compreenderem quando tive que estar ausente nos momentos de dedicação maior à pós-graduação.

Ao Mário Henrique, por ter trazido ainda mais luz à nossa família, por ser mais que um padrasto, um amigo com quem podemos contar a qualquer momento e parte fundamental da nossa família. Agradeço por não medir esforços para ver minha mãe feliz e por nos trazer tanto bem. Muito obrigada!

Ao meu esposo, Eduardo, meu companheiro de vida, minha melhor escolha, meu outro grande exemplo de professor. Agradeço por apoiar todas as minhas decisões, mesmo aquelas que as outras pessoas julgam mais malucas. Na vida acadêmica, por ter sempre me impulsionado a querer crescer profissionalmente, entender as minhas ausências, e, mais do que isso, por ter sido muitas vezes a minha Fortaleza para continuar. Depois do amor, o maior

sentimento que tenho por você é admiração e, se algum dia eu for metade do que você é como professora, sei que terei impactado a vida de muitas pessoas positivamente. Amo você!

Agradeço à família Mallmann, da qual agora eu faço oficialmente parte, por sempre me receberem em sua casa como filha. Por confiarem em mim, por me amarem e por me apoiarem, em especial, a minha amada sogra Jovina, à quem tenho como segunda mãe!

À minha afilhada Julinha por ter trazido mais luz e alegria aos meus dias, me ensinando uma nova forma de amar!

Aos meus demais familiares, que sempre deram total apoio às minhas decisões, que vibram com todas as minhas conquistas e que sempre demonstraram muito orgulho por tudo o que eu faço. Agradeço principalmente à minha tia Maria Alice, por ser uma tia que mais parece ser uma segunda mãe, sempre se fazendo tão presente e nos enchendo de muito amor e carinho. Ao meu avô Pedro Vasconcelos e a meu primo João Victor, os dois farmacêuticos que inspiraram minha escolha profissional. De meu avô herdei minha vocação; do meu primo, que é quase como um irmão, a inspiração.

Aos meus amigos. Pode parecer clichê, mas tenho vocês realmente como a família que Deus me permitiu escolher. Como sou feliz em tê-los!

Inicialmente, às minhas amigas de colégio (Glorinha, Fernanda, Carol e Sabrina) que, desde o início, alimentaram minha vontade de ser professora participando das brincadeiras de escolinha que eu inventava. É, já pensaram se aqueles quadradinhos coloridos do santa cecília falassem? Iriam contar muitas histórias felizes da minha vida da qual vocês fizeram parte. Agradeço por compreenderem que, nessa jornada, eu precisaria me ausentar de muitos momentos importantes.

Ao meu amigo Victor, meu melhor amigo. Agradeço por estar presente na minha vida desde os meus 15 anos e por nunca mais ter saído dela. Você me viu passar por todas as etapas importantes da vida e esteve presente em todas elas. Obrigada por vibrar com as minhas conquistas, por acalantar as minhas tristezas. Amo você!

Às minhas amigas de faculdade, em especial às minhas cobras, com certeza o maior presente que a UFC me deu! Vocês foram os meus pilares, o meu apoio, a minha amizade sincera, a minha diversão, o meu choro, a minha graça, a minha força. E tenho certeza de que, a cada dia, nossa amizade se solidificará ainda mais. Amo todas vocês! Aos demais amigos, como sou feliz em tê-los! Fui agraciada com tantas pessoas

boas na minha vida que nem tenho palavras para agradecer. Ao meu amigo Gadelha, por uma amizade que nasceu de forma natural e hoje é uma das mais verdadeiras.

Às minhas amigas da MK, presentes que o mundo cor de rosa me trouxe. Agradeço pelo apoio principalmente nos dias mais desafiadores. Como diz a minha diretora Keila, não estamos apenas juntas, estamos unidas. Não tenho dúvidas que é através disso e dos nossos pilares Deus, Família e Carreira que vem o nosso sucesso.

Aos amigos que ganhei do Eduardo, em especial ao Marcelo por ter contribuído com as imagens que foram utilizadas neste trabalho.

Agradeço a minha amada professora Cléa, minha “mãe científica”, por ter me aceitado como sua aluna. Estamos celebrando 8 anos de trabalho juntas, pois cheguei na vida dela através da graduação. Sempre costumo dizer que para mim ela não é apenas professora, mas um exemplo de educadora, de mãe, de amiga, de esposa. Deus não poderia ter me presenteado com orientadora melhor! Feliz daquele que encontra líderes que tem os mesmos valores que os seus. E eu espero poder retribuir todo esse carinho da melhor forma possível, mostrando sempre dedicação, resultado, trabalho e, mais ainda, dedicando-lhe minha amizade sincera.

Aos meus amigos do LabNeuro, que sempre me receberam tão bem. Muitas pessoas questionam o que tem de diferencial na neuro. E o que eu posso garantir, é que vai muito além da capacidade intelectual, que é tremenda. Temos um grupo extremamente preparado para a pesquisa, mas principalmente disposto a ajudar, trocar ideias, colaborar. Nosso segredo é união! Agradeço a todos, mas tenho que fazer alguns em especial; Aos alunos de iniciação científica: Laura (hoje mestre), Gabriel (hoje concludente de medicina), Layla, Luiz, Tiago (hoje mestrando), Daniel (hoje mestrando) e Adriano. Agradeço muito pela imensa colaboração nessa pesquisa e, mais ainda, pela amizade sincera que foi construída no decorrer dela. Aos alunos de pós-graduação, em especial a Íris (hoje doutora), por ter me ensinado tudo desde o primeiro passo. Ao grupo dos cafés mais produtivos que eu já vi (Clea, Victor, Alyne, Raquell e Natália). Agradeço a minha amiga Natália (hoje doutora), meu exemplo de mãe e profissional. Desde o início da faculdade a vida nos coloca nos mesmos trabalhos e aprendo muito com a sua organização e competência. À Alyne, por tanto ter me ajudado, pela amizade e por me atender nos horários mais inconvenientes. Dentre todos a pessoa a quem mais tenho gratidão: a minha amiga Raquell (hoje pós doc), que esteve presente em exatamente todos os passos da realização deste trabalho. Tanto que poderia

receber o título de doutorado mais uma vez. Obrigada por sacrificar tanto tempo que seria importante pra você com algo que tinha maior valor pra mim.

Aos meus demais colegas da pós, por tornarem o ambiente de pesquisa mais produtivo e agradável. Agradeço em especial a Giovanna, pela colaboração com a citometria de fluxo e a Andrea, que é hoje uma de minhas melhores amigas.

À equipe do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Medicamentos, especialmente a Aura, Laura, Cris e Adelanía.

Aos professores e farmacêuticos da universidade que fizeram parte do meu crescimento, alguns dos quais foram também meus orientadores em outros momentos da vida acadêmica, e que contribuíram para a minha base científica: Nirla, Teresinha, Janete, Eudiana, Teresa (in memoriam), Janete, Dra. Eugenie, Hannah e Fátima.

À Universidade Federal do Ceará, por durante 12 anos ter sido a minha segunda casa, proporcionando a bagagem acadêmica necessária para o meu desenvolver profissional.

Aos demais professores da pós-graduação, especialmente às professoras Silvânia, Danielle, Glaucé, Marta, Odorico e ao professor Roberto César, por terem feito a diferença desde o processo seletivo até a conclusão do doutorado. Agradeço em especial à doutora Glaucé, por nos auxiliar com material necessário para essa pesquisa.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Paraíba, representado pelo professor e doutor José Maria Barbosa Filho e pelo doutor Stanley Juan Chavez Gutierrez, que nos cederam gentilmente a substância de objeto deste estudo e todas as informações que foram necessárias para sua concretização.

Aos camundongos, por terem cedido suas humildes vidinhas para o desenvolvimento científico desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora. Não tenho palavras para agradecer o quanto fiquei lisonjeada de poder contar com tamanha contribuição, pois essa banca não foi escolhida à toa. Aqui tenho professoras que agregaram de forma importante na minha vida acadêmica: Clea, Marta, Renata, Micheline e Andrea. Minha admiração pelo trabalho de vocês é enorme e tenho certeza de que esse trabalho será engrandecido com as sugestões que me serão dadas.

Ao financiamento cedido pelas instituições de fomento Funcap, Capes e CNPq.

“Para ser grande, sê inteiro
Nada teu exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa
Põe o quanto és no mínimo que fazes
Assim em cada lago a lua toda brilha
Porque alta vive.” (Fernando Pessoa)

RESUMO

O estresse está crucialmente relacionado à fisiopatologia dos transtornos do humor, incluindo a depressão. Como não há terapia eficaz, a pesquisa sobre novas substâncias é fundamental. Em roedores, vários achados indicaram que a administração de corticosterona induz aspectos comportamentais e neuroquímicos da depressão. Recentemente, Riparina III (Rip III) mostrou propriedades antidepressivas em ensaios realizados em modelos animais. Assim, nosso objetivo foi investigar os efeitos de Rip III em testes comportamentais, níveis de monoaminas, expressão de AMPA e ERK, estresse oxidativo e níveis de citocinas no modelo de depressão crônico induzido por corticosterona. Para isso, camundongos *swiss* foram tratados com administração subcutânea de corticosterona por 21 dias. Além disso, nos últimos 7 dias, Rip III ou fluvoxamina (Flu) também foram administrados por via oral (VO) em grupos de teste específicos. Grupos controle receberam injeções de salina subcutâneas ou água destilada VO. No final da linha do tempo, os animais foram sacrificados e as áreas hipocampo (HIP), córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE) dissecados para análise neuroquímica. As alterações cerebrais após indução de estresse foram confirmadas e Rip III reverteu as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por corticosterona. Nossos resultados destacaram o potencial farmacológico antidepressivo, ansiolítico, antioxidante e antiinflamatório de Rip III.

Palavras-chave: Depressão. Corticosterona. Riparina. Estresse oxidativo. Citocinas.

ABSTRACT

RIPARINA III IS A PROMISING DRUG IN THE TREATMENT OF DEPRESSION?

Stress is crucially related to the pathophysiology of mood disorders, including depression. Since there is no effective therapy, research on new substances is paramount. In rodents, several findings have indicated that corticosterone administration induces behavioral and neurochemical aspects of depression. Recently, riparin III (Rip III) has shown antidepressant-like properties in trials performed on animal models. Thus, our goal was to investigate the Rip III effects in behavioral tests, monoamines levels, expression of AMPA and ERK, oxidative stress and cytokines levels in chronic corticosterone-induced model of depression. To do this, swiss mice were treated with subcutaneous administration of corticosterone for 21 days. In addition, for the last 7 days, Rip III or fluvoxamine were also administered *per os* in specific test groups. Control groups received subcutaneous saline injections or distilled water *per os*. At the end of the timeline, the animals were killed and their hippocampi, prefrontal cortex, and striatum dissected for neurochemical analysis. Brain changes following corticosterone administration were confirmed, and Rip III could reversed the most abnormal behavioral and neurochemical corticosterone-induced alterations. Our results highlighted the antioxidant, anti-inflammatory, anxiolytic and antidepressant pharmacological potential of Rip III.

Keywords: Depression. Corticosterone. Riparin. Oxidative stress. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Critérios diagnósticos segundo DSM-V para depressão	21
Figura 2 – Envolvimento do eixo HPA na resposta ao estresse.....	23
Figura 3 – Vias de sinalização do BDNF.....	27
Figura 4 – Interação de células imunes com o eixo HPA na liberação de citocinas inflamatórias.....	29
Figura 5 – Mecanismos de defesa antioxidante.....	31
Figura 6 – Folha da <i>Aniba Riparia</i>	35
Figura 7 – Estrutura química da riparina III.....	36
Figura 8 – Esquema de tratamento.....	41
Figura 9 – Aparato e parâmetros avaliados no Teste do Nado Forçado.....	42
Figura 10 – Aparato utilizado no teste da placa perfurada.....	43
Figura 11 – Aparato utilizado no teste de esquiva passiva.....	44
Figura 12 – Possível mecanismo de ação da Riparina III.....	69
Quadro 1 – Principais representantes antidepressivos segundo classes farmacológicas...	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, no (a) tempo de imobilidade e (b) tempo de climbing em camundongos no teste de nado forçado	51
Gráfico 2 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, no número de mergulhos em camundongos no teste da placa perfurada	52
Gráfico 3 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, na reversão da perda de (a) memória curta e (b) memória tardia induzida por Cort	53
Gráfico 4 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, na expressão de (a) AMPA total e (b) AMPA fosforilado	54
Gráfico 5 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, na expressão de (a) ERK total e (b) ERK fosforilada	55
Gráfico 6 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, nos níveis de nitrito no (a) CPF, (b) HIP e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona	56
Gráfico 7 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, nos níveis de MDA no (a) CPF, (b) HIP e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona	56
Gráfico 8 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, nos níveis de GSH no (a) CPF, (b) HIP e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona	57
Gráfico 9 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, nos níveis de SOD no (a) CPF, (b) HIP e (c)CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona	57
Gráfico 10 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, nos níveis de catalase no (a) CPF, (b) HIP e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona	58
Gráfico 11 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, nos níveis de citocinas do perfil Th1/Th17 (a) IL-2, (b) TNF- α , (c) IFN- γ e (d) IL-17	59

Gráfico 12 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, nos níveis de citocinas do perfil Th2 (a) IL-4, (b) IL-6, (c) IL-10	60
---	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), VO, na modulação dos níveis de monoaminas.....	54
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-HIAA	Ácido 5 hidroxí indolacético
ATC	Antidepressivos Tricíclicos
AC	Administração de corticosterona
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxí-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAN	Ácidos Nucléicos Totais
CAT	Catalase
Cort	Corticosterona
CREB	Fator de Transcrição de proteína ligado ao cAMP
CV	Captação do Vermelho Neutro
DA	Dopamina
DM	Depressão Maior
DRT	Depressão Resistente ao Tratamento
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
ERK	Quinase ativada extracelularmente
EAC	Estresse por administração de corticosterona
Flu	Fluvoxamina
GC	Glicocorticoide
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione redutase
HVA	Ácido homovanílico
HPA	Eixo Hipofisário Adrenal
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2

IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL- 10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IMAO	Inibidores de Monoaminoxidase
INF- γ	Interferon gama
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
ISRSN	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NA	Noradrenalina
Rip III	Riparina III
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TNF	Teste do Nado Forçado
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRKb	Receptor de tirosina quinase B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Considerações gerais sobre a depressão	20
1.2	Fisiopatologia da depressão	22
1.2.1	<i>Envolvimento do eixo hipotalâmico hipofisário adrenal (HHA).....</i>	22
1.2.2	<i>Teoria das monoaminas</i>	25
1.2.3	<i>Envolvimento das neurotrofinas</i>	26
1.2.4	<i>Envolvimento das citocinas</i>	28
1.2.5	<i>Estresse oxidativo</i>	30
1.3	Tratamento da depressão	32
1.3.1	<i>Abordagem farmacológica da depressão</i>	32
1.4	Modelos animais de depressão	34
1.5	Riparina III	35
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	MÉTODOS	39
3.1	Material botânico	39
3.2	Animais	39
3.3	Drogas utilizadas	40
3.4	Protocolo experimental e tratamento dos animais	40
3.5	Testes comportamentais	41
3.5.1	<i>Teste do nado forçado</i>	41
3.5.2	<i>Teste da placa perfurada</i>	42
3.5.3	<i>Teste da esquiva passiva</i>	43
3.6	Testes neuroquímicos	44
3.6.1	<i>Dosagem de monoaminas</i>	44
3.6.1.1	<i>Soluções reagentes</i>	45
3.6.2	<i>Avaliação do estresse oxidativo</i>	46
3.6.2.1	<i>Determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)</i>	46
3.6.2.2	<i>Determinação da concentração da Glutathiona Reduzida (GHS)</i>	46

3.6.2.3	<i>Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	47
3.6.2.4	<i>Determinação da produção de nitrito/nitrato</i>	47
3.6.2.5	<i>Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)</i>	48
3.6.2.6	<i>Dosagem de proteína pelo método de Bradford</i>	48
3.6.3	<i>Dosagem de citocinas</i>	49
3.6.4	<i>Determinação da expressão de ERK/AMPA por western blotting</i>	49
3.7	Análise estatística	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Testes comportamentais	51
4.1.1	<i>Teste do nado forçado</i>	51
4.1.2	<i>Teste da placa perfurada</i>	52
4.1.3	<i>Teste de esquiva passiva</i>	52
4.2	Testes neuroquímicos	53
4.2.1	<i>Níveis de monoaminas</i>	53
4.2.2	<i>Expressão de AMPA</i>	54
4.2.3	<i>Expressão de ERK</i>	55
4.2.4	<i>Estresse oxidativo</i>	55
4.2.4.1	<i>Níveis de nitrito/nitrato</i>	55
4.2.4.2	<i>Níveis de malondialdeído</i>	56
4.2.4.3	<i>Níveis de glutathiona reduzida</i>	57
4.2.4.4	<i>Atividade enzimática da superóxido dismutase</i>	57
4.2.4.5	<i>Atividade enzimática da catalase</i>	58
4.2.5	<i>Envolvimento das citocinas</i>	58
4.2.5.1	<i>Citocinas perfil Th1/Th17</i>	58
4.2.5.2	<i>Citocinas perfil Th2</i>	60
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	71
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A – TRABALHOS PUBLICADOS COM A RIPARINA III	86
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a depressão

A depressão é um transtorno de humor grave comum, crônico e recorrente que tem sido relatado como a principal causa de incapacidade em todo o mundo, contribuindo de forma importante para a carga global de doenças (OPAS, 2018). Trata-se de um transtorno presente em todo o mundo: estima-se que mais de 300 milhões de pessoas sofram com ela, sendo mais frequente entre a adolescência e início da vida adulta e sendo duas vezes mais prevalente em mulheres, principalmente na puberdade (WHO, 2018). No Brasil, cerca de 5,8% da população sofre de depressão, o que equivale a uma média de 11,5 milhões de casos registrados. O índice é o maior na América Latina e o segundo maior nas Américas, atrás apenas dos Estados Unidos, que registram 5,9% da população com o transtorno e um total de 17,4 milhões de casos (BRASIL, 2017).

A depressão (ou transtorno depressivo maior) é uma doença comum e séria que afeta negativamente a forma como o paciente se sente, a maneira como pensa e como atua. Sua sintomatologia é bem variada, de tal forma que o paciente pode apresentar sintomas físicos tais como dor (dor de cabeça, músculo-esquelético, abdominal), sintomas relacionados ao humor (humor deprimido, desamparo, perda de interesse e da capacidade de obter prazer, retraimento social, choro, diminuição da autoconfiança, pessimismo, irritabilidade), alterações cognitivas (dificuldades de memória, concentração e aprendizagem), alterações do sono e apetite ou até mesmo tentativas de suicídio (BENTLEY, PAGALILAUAN, SIMPSON, 2014; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2017).

A condição é diferente das variações comuns de humor e das respostas emocionais de curta duração aos desafios da vida cotidiana. Especialmente quando de longa duração e com intensidade moderada ou grave, a depressão pode se tornar uma crítica condição de saúde. Ela pode causar à pessoa afetada um grande sofrimento e disfunção no trabalho, na escola ou no meio familiar e, na pior das hipóteses, a depressão pode levar ao suicídio. Cerca de 800 mil pessoas morrem por suicídio a cada ano - sendo essa a segunda principal causa de morte entre pessoas com idade entre 15 e 29 anos (OPAS, 2018).

Também estão relatadas na literatura outras condições clínicas que podem ser associadas aos sintomas de depressão, tais como: alterações na tireóide, tumor cerebral, deficiência de vitaminas e distúrbios cardiovasculares (HAMMAD, LAUGHREN, RACOOSIN, 2006).

O diagnóstico de depressão é essencialmente clínico, incluindo uma entrevista com profissional habilitado. É um desafio para a medicina pelo fato de não existirem exames conclusivos, apenas complementares, como por exemplo os de neuroimagem. Entretanto, podem ser solicitados exames para descartar outras condições como as citadas anteriormente. A avaliação é identificar sintomas específicos, histórico médico e familiar, fatores culturais e fatores ambientais para chegar ao diagnóstico e planejar um curso de ação (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2017).

O Manual diagnóstico estatístico de transtornos mentais (DSM-5) estipula nove critérios para depressão, dos quais cinco devem estar presentes. Para fechar o diagnóstico é necessário que o sintomas persistam por, pelo menos, duas semanas e que um deles seja obrigatoriamente (1) humor deprimido ou (2) perda do interesse ou prazer (Figura 1).

Figura 1 – Critérios diagnósticos segundo o DSM-V para depressão

Pelo menos 5 sintomas, presentes por pelo menos 2 semanas, na maioria dos dias:
Um sintoma deve obrigatoriamente ser:
- humor depressivo
- marcada diminuição do interesse ou prazer na maioria das atividades ou todas elas
Outros sintomas:
- emagrecimento sem relação com dietas, ganho de peso significativo ou alterações do apetite
- hipersônia ou insônia
- agitação ou depressão psicomotora
- fadiga ou sensação de perda de energia
- sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada
- indecisão ou dificuldade para se concentrar ou raciocinar
- pensamentos de morte recorrentes ou ideação suicida (com ou sem planejamento)
Sintomas que causam impacto significativo nas diversas esferas, tais como social ou ocupacional
Sintomas que não são decorrentes do uso de alguma substância/medicamento ou de outra enfermidade
Sintomas não explicados por desordem esquizoafetiva ou psicótica, além de não haver episódio hipomaniaco ou maníaco

Fonte: Adaptado de DSM-V.

Acredita-se que sua etiologia seja resultando de anormalidades celulares moleculares que interagem com fatores genéticos e ambientais (KRISHNAN, NESTLER, 2008). Atualmente, a depressão é considerada um distúrbio heterogêneo e complexo com múltiplas etiologias (JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2017), sendo o estresse o principal fator ambiental descrito na predisposição dos indivíduos a depressão (ANDREWS *et al.*, 2011). Inclusive, o estudo de Keller (2007) mostrou que 88,1% dos pacientes tinham a depressão diagnosticada após algum evento estressante, enquanto apenas 11,9% pareciam apresentar etiologia endógena, ou seja, o episódio depressivo ocorreu sem algum engatilhador ambiental.

1.2 Fisiopatologia da depressão

Existem diversas hipóteses que buscam justificar a fisiopatologia da depressão. A hipótese mais antiga e estudada está relacionada a depleção de monoaminas e, frequentemente, os estudos acerca da depressão são baseados nesta hipótese (HAMON, BLIER, 2013). Entretanto, devido a terapia em muitos casos não ser suficiente para remissão dos sintomas, muitos estudos têm sido conduzidos levando em consideração outras hipóteses sobre a doença (CAI, HUANG, HAO, 2015; PASQUALI *et al.*, 2018; JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018). Dentre elas, destacam-se: o envolvimento das neurotrofinas (PERITO, FORTUNATO, 2012; LUISIER *et al.*, 2013), o aumento de citocinas inflamatórias (CAI, HUANG, HAO 2015; MONDIN, 2016), a ação do estresse oxidativo (LEE, 2009; MAES, 2011; KAPCZINSKI, 2014; LOPRESTI, 2014; CAI *et al.*, 2015; MONDIN, 2016) e níveis elevados de hormônios do estresse. O fato de não haver uma hipótese única que justifique todos os sintomas e a associação com outras doenças, é o que torna a sua compreensão desafiadora (JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2017).

1.2.1 Envolvimento do eixo hipotalâmico hipófise adrenal (HHA)

O termo estresse vem da física e refere-se a uma ameaça real ou potencial à homeostasia. O estresse humano pode colaborar para a patogênese da depressão e também influenciar na gravidade e recorrência desta doença debilitante (JOCA, PADOVAN, GUIMARÃES, 2003). Parker *et al.* (2003) demonstraram em estudo que até 85% dos pacientes experienciam significantes situações conflitantes antes do início dos sintomas depressivos.

Os seres vivos desenvolvem ao longo de sua história evolutiva mecanismos de enfrentamento às condições adversas originadas nos ambientes geofísico e social. Esta resposta adaptativa envolve diferentes sistemas funcionais, particularmente, os sistemas nervoso, endócrino e imune, sendo denominada de resposta ao estresse e gerando as adaptações necessárias para garantir a sobrevivência e a homeostase dos indivíduos (SOUSA, SILVA, GALVÃO-COELHO, 2015).

Figura 2 – Envolvimento do eixo HPA na resposta ao estresse



Fonte: Adaptado de Sakellario e Stefanatou (2017). Eixo HPA - a interrelação do hipotálamo com a hipófise e as suprarrenais é um componente central na resposta neuroendócrina do cérebro ao estresse. O hipotálamo, quando estimulado, secreta o hormônio liberador da corticotropina (CRH) no sistema porta-hipotálamo, que faz o aporte sanguíneo para a parte anterior da hipófise. O CRH estimula a hipófise (as setas vermelhas indicam as vias de estimulação) a secretar o hormônio adenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH faz que as suprarrenais liberem o cortisol, um hormônio clássico de estresse (as setas azuis indicam os efeitos inibitórios) que age no hipotálamo para inibir a liberação contínua de CRH. Além de um potente imunorregulador, o cortisol age em muitas partes do sistema imunológico para evitar que reaja de forma excessiva e lese células e tecidos saudáveis.

Verifica-se, através da figura 2, que a principal resposta neuroendócrina ao estresse acontece pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que consiste em estimular os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e consequentemente liberar os neuropeptídeos, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (VP), que estimulam a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Isto leva à estimulação

da secreção de glicocorticoides (GC) pelo córtex adrenal, que são essenciais para a adaptação ao estresse (AGUILERA, 2011).

Além de ativar o eixo HPA, os peptídeos hipotalâmicos VP e CRH são liberados dentro do cérebro onde eles são em grande parte responsáveis por respostas comportamentais e autonômicas ao estresse (VALE *et al.*, 1983 *apud* AGUILERA, 2011). Os GC atuam em nível cerebral, exercendo influência inibitória no núcleo paraventricular a fim de modular as atividades do eixo HHA por meio de processos de retroalimentação negativa (VINCENT, 2013). Quando os receptores estão disponíveis em nível alto, a inibição por retroalimentação do núcleo paraventricular é aumentada, a atividade no eixo HHA é fortemente controlada. Contudo, quando estes receptores estão em nível baixo, a inibição por retroalimentação é ineficiente e o estímulo que provoca a resposta no eixo HHA permite um aumento, maior que o normal, nos níveis de cortisol (DE KLOET; JOELS; HOLLSBOER, 2005; DUMBELL; MATVEEVA; OSTER, 2016).

Assim, a ativação aguda do eixo HPA durante o estresse é necessária para a adaptação do organismo. Entretanto, a exposição excessiva a níveis elevados de hormônios do estresse pode ser prejudicial e causar prejuízos potenciais ao organismo, predispondo às doenças psiquiátricas, reprodutivas, imunológicas, distúrbios metabólicos e cardiovasculares. Alguns sinais e sintomas depressivos, tais como excesso de culpa pessoal e desesperança, alterações do apetite e peso, diminuição do comportamento sexual, distúrbios do sono, atividade psicomotora alterada, comprometimento da memória e disforia crônica podem ser relacionados a uma hiperestimulação do eixo HPA. Portanto, o mesmo hormônio que é vital para a sobrevivência do organismo durante o estresse agudo pode também predispor o organismo a doença se a exposição for prolongada (D'AMATO, RIZZI, MOLIS, 2001; MCEWEN, 1998; MCEWEN, 2000; HUETHER *et al.*, 1999; YU, MCWEEN, 2007; AGUILERA, 2011; ZUNSZAIN *et al.*, 2011; SOUSA, SILVA, GALVÃO-COELHO, 2015; JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018).

O hipocampo é particularmente susceptível aos efeitos danosos do estresse prolongado. Em humanos, níveis elevados de cortisol durante a vida predizem atrofia hipocampal e estão relacionados aos déficits de memória observados em pacientes deprimidos, evidenciados pela diminuição da ramificação dendrítica, diminuição da neurogênese e diminuição da expressão de RNAm do receptor de glicocorticoides no hipocampo (SHELIN, GADO, KRAEMER, 2001; PHAM *et al.*, 2003; FUCHS, 2007; PERITO, FORTUNATO,

2012; DILLON, PIZZAGALLI, 2017). Em animais, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa também mostraram alterações hipocâmpais importantes (VASCONCELOS *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2017; CAPIBARIBE, 2018; LOPES *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*, 2019).

1.2.2 Teoria das monoaminas

A hipótese da deficiência de monoaminas descreve que os sintomas depressivos são provenientes de uma depleção de noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT). Essa é uma das hipóteses mais antigas relacionadas à depressão e teve início a partir do mecanismo de ação de alguns fármacos. Por exemplo, o uso crônico da reserpina no tratamento de pacientes com hipertensão ou esquizofrenia apresentava um risco de desenvolvimento da depressão em 25% dos casos (ROMEIRO *et al.*, 2003). Essa evidência clínica, associada com o mecanismo de ação deste fármaco, que consiste na inibição do armazenamento de 5-HT e NA nas vesículas das terminações nervosas, gerou essa hipótese (MELO, 2012; JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018).

A maioria dos neurônios serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos estão localizados nos núcleos cerebrais e tronco encefálico e são projetados em áreas de todo o cérebro. Esta anatomia sugere que os sistemas monoaminérgicos estão envolvidos na regulação de diversas funções cerebrais, incluindo humor, atenção, processamento de recompensas, sono, apetite e cognição. Quase todos os compostos que inibem a recaptação de monoaminas, levando a uma concentração aumentada destas na fenda sináptica, provaram ser antidepressivos clinicamente eficazes (BELMAKER, AGAM, 2008). Inibir a enzima monoamina oxidase (MAO), que induz uma maior disponibilidade de monoaminas em neurônios pré-sinápticos, também resulta em efeitos antidepressivos. Essas observações levaram à hipótese de deficiência de monoaminas sendo a serotonina a monoamina de maior importância no contexto da doença (HASLER, 2010; JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018).

Existem outras possibilidades que explicam as alterações de neurotransmissores. Por exemplo, devido à resposta ao estresse, alguns neurotransmissores, incluindo glutamato, NA e histamina, podem interagir resultando em diminuição da produção de 5-HT (JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018). A resposta produzida frente a um agente estressor pode ocorrer em uma escala temporal que vai de milissegundos a dias, mas de forma geral o primeiro efeito detectado é a liberação de catecolaminas pelo SNC que interagem com o SNP (Sistema Nervoso Periférico) e ativam o eixo HPA, gerando estados de alerta de luta ou fuga nos indivíduos

(VALLE, 2011; ZUARDI, 2014). Havendo uma resposta excessiva, e dependendo da suscetibilidade pessoal de cada indivíduo, o estado de alerta pode deixar o organismo vulnerável a danos, devido ao excesso de adrenalina e cortisol, possibilitando o surgimento de vários problemas psicológicos, como a depressão (VALLE, 2013).

1.2.3 Envolvimento das neurotrofinas

A neuroplasticidade envolve diferentes processos, incluindo: formação dendrítica, remodelação sináptica, *long-term potentiation*, desenvolvimento axonal e neurogênese (VARANDAS, 2003). A neurogênese, em indivíduos adultos, envolve a geração de novos neurônios e conexões neuronais no giro denteado do hipocampo e na área subventricular dos ventrículos laterais. Com relação à fisiopatologia da depressão, foi proposto que a falta ou redução da capacidade de neurogênese em adultos causa depressão (JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018).

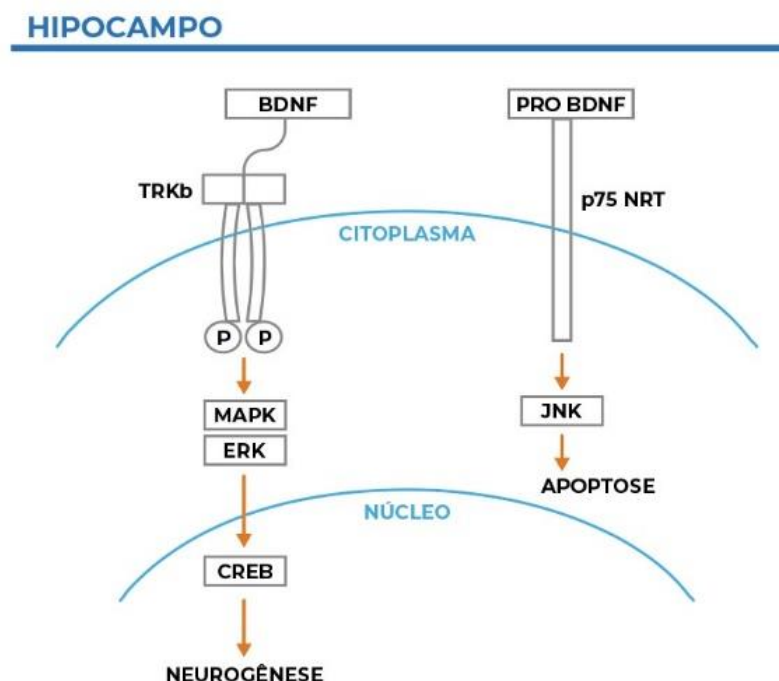
A modulação da transmissão e plasticidade sináptica é promovida pelas neurotrofinas, proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático de células neuronais. O NGF (fator de crescimento do nervo, do inglês *nerve growth factor*), o BDNF (Fator Neurtrófico Derivado do Cérebro) e neurotrofina 3 (NT-3), NT-4/5 e NT-6 pertencem a família de neurotrofinas, sendo o BDNF a principal estudada e envolvida na patogênese da depressão (FORTUNATO *et al.*, 2009; PERITO, FORTUNATO, 2012).

A hipótese neurotrófica da depressão postula que o estado depressivo está associado à diminuição da neuroplasticidade e atrofia neuronal em áreas do cérebro relacionadas com humor e memória (LANG, BORGWARDT, 2013). Foi demonstrado que os níveis sanguíneos de neurotrofinas são mais baixos em pacientes deprimidos em comparação com controles saudáveis e que estes níveis aumentam após os tratamentos bem sucedidos com drogas antidepressivas e eletroconvulsoterapia (BRUNONI *et al.*, 2008, BRUNONI *et al.*, 2014; MOLENDIJK *et al.*, 2014; MELEIRO, 2014; DILLON, PIZZAGALLI, 2017; ZALETEL, FILIPOVIC, PUSKAS, 2017).

O BDNF existe sob duas formas: pro e maduro. O Pro-BDNF liga-se preferencialmente ao receptor p75 responsável por apoptose. O BDNF maduro liga-se ao receptor tirosina quinase B (TrkB) que através da via de sinalização MAPK/ERK (Proteína quinase ativadora de mitógeno/Quinase regulada por sinal extra celular) levam à fosforilação e ativação do fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB) que medeia a transcrição de genes que são essenciais para a sobrevivência e diferenciação de

neurônios. Essa via de sinalização é particularmente importante nos neurônios excitatórios do hipocampo e está associada a aprendizagem e memória (ASHTANA *et al.*, 2016; ZALETEL, FILIPOVIC, PUSKAS, 2017) (Figura 2).

Figura 3 – Vias de sinalização do BDNF



Fonte: Autoria própria

A DM tem sido associada com danos na via de sinalização que controla a neuroplasticidade e sobrevivência celular e com a diminuição de número e tamanho de células nervosas no hipocampo (MANJI, DREVETS, CHARMEY, 2001), diminuição gradual do volume hipocampal, que pode explicar os déficit de memória de alguns pacientes, e também vários outros sintomas do transtorno. Além disso, alterações no sistema de dopamina estriatal podem estar relacionados com a anedonia apresentada por muitos pacientes (AAN, MATHEW, CHARNEY, 2009)

1.2.4 Envolvimento das citocinas

Como a depressão é um transtorno complexo, é provável que outras alterações complementem a patogênese da doença. Evidências mostram que processos inflamatórios mediados por citocinas, principalmente as interleucinas (IL), desempenham um papel importante no desenvolvimento de distúrbios de humor (CHAVES *et al.*, 2019), já que estas agem no SNC e exercem papéis fundamentais na função dos neurotransmissores, regulação neuroendócrina através da ativação do eixo HHA, além de neuroplasticidade e suporte neurotrófico (BORTOLATO *et al.*, 2015; GOLD, 2015; LOTRICH; ALBUSAYSI; FERRELL, 2013; NIKKHESLAT; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2018; YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014).

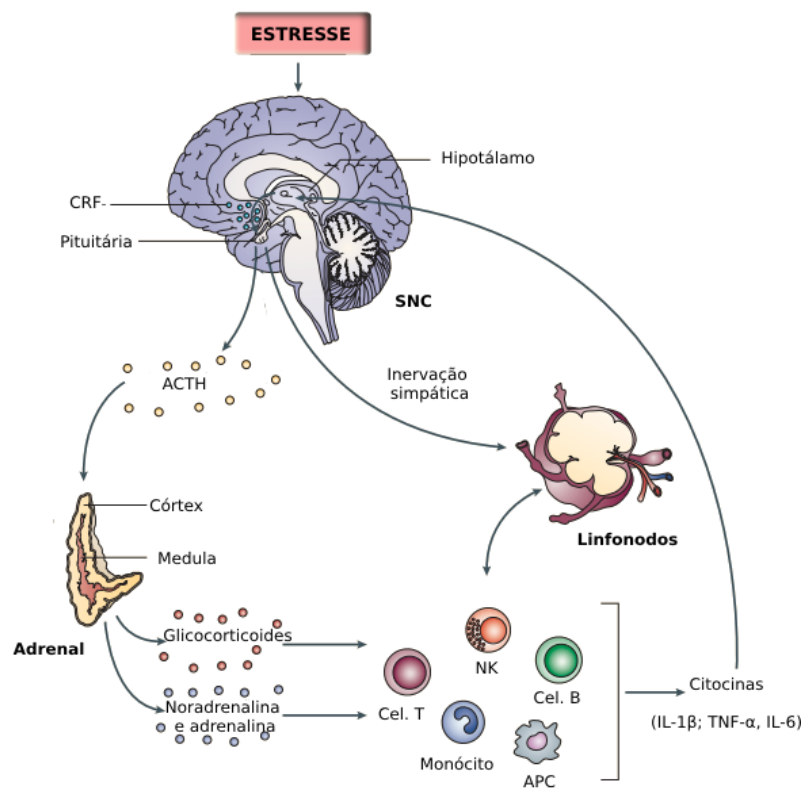
O link entre neuroinflamação e depressão maior é evidenciado pelo fato de que várias condições clínicas que resultam em neuroinflamação significativa no cérebro (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, traumatismo cranioencefálico e esclerose múltipla) estão associadas a altas taxas de prevalência de DM. A ideia de que as citocinas podem ter um possível papel no desenvolvimento da depressão está diretamente ligada ao estresse crônico (JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018).

As citocinas são uma classe de polipeptídeos de sinalização secretados por células imunes e estão amplamente distribuídas nos sistemas imunológico e nervoso. A resposta inflamatória envolve linfócitos do tipo Th1, Th2 e Th17. A resposta Th1 envolve a produção das citocinas inflamatórias do tipo IL-2, INF- γ e TNF- α . Entretanto, nos últimos anos, os LTh17 tem sido também responsáveis pelo processo fisiológico de diversas doenças. A resposta Th2 é representada pelas citocinas IL-4, IL-6 e IL-10. No geral, elas são produzidas por macrófagos, células *natural killer* e linfócitos T, entretanto no cérebro, essa produção ocorre mais pela micróglia e astrócitos.

Em situações de estresse, há um aumento na secreção de citocinas inflamatórias, tais como: interleucinas (IL) do tipo IL-2, IL-6, IL-17, além de interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Inclusive, a revisão da literatura feita por Lotrich (2015) descreve estudos que mostram a associação da administração destas com os sintomas depressivos. Além disso, pode ocorrer uma diminuição de citocinas anti inflamatórias, tais como IL-4 e IL-10. As alterações dos níveis citocinas podem causar resistência aos glicocorticoides, excitotoxicidade e podem reduzir o número de sinapses e a expressão do BDNF levando à depressão (HAN, YU, 2014; CAI, HUANG, HAO, 2015).

Das citocinas inflamatórias, destacam-se IL-6 e o TNF- α (Figura 04) por apresentarem maior efeito no estímulo do eixo HHA. Há evidências que sugerem que a IL-6, a principal citocina endócrina, desempenha o papel principal na estimulação imune do eixo, especialmente na inflamação crônica, além da associação do seu aumento com os níveis reduzidos de serotonina e BDNF (MIURA *et al.*, 2008; TSIGOS; CHROUSOS, 2002; LOTRICH, 2015). Inclusive, alguns inibidores seletivos da recaptação de serotonina, parecem reduzir os seus níveis.

Figura 4 - Interação de células imunes com o eixo HHA na liberação de citocinas inflamatórias



Fonte: Chaves (2019). HHA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; CRF: fator de liberação da corticotrofina; ACTH: hormônio adrenocorticotrópico.; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; APC: célula apresentadora de antígeno NK, células *natural killer*.

1.2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) excedem a capacidade antioxidante das células, provocando diferentes tipos de dano oxidativo aos componentes e funções celulares. Evidências clínicas e pré-clínicas indicam que essa produção pode prevalecer sobre os sistemas de defesa cerebral, predispondo doenças psiquiátricas, tais como a depressão (MAES, 2011; SMAGA *et al.*, 2015; VAN VELSEN *et al.*, 2017). O envolvimento do estresse oxidativo na depressão pode ser explicado pelo conceito de que o excesso de radicais livres é tóxico para as células neuronais, afetando a fisiologia do cérebro e sendo, portanto, um mecanismo chave na doença (GUPTA, RADHAKRISHNAN, KURH, 2015).

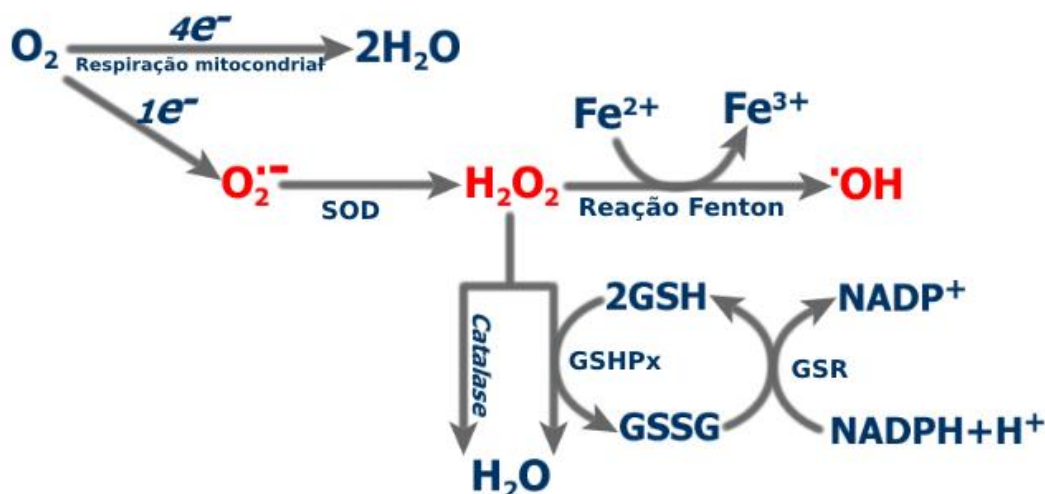
As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}^\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

O nitrito é uma espécie reativa de nitrogênio, produto tóxico das reações oxidantes, altamente reativo, podendo atacar lipídeos, proteínas e o DNA (CARVALHO *et al.*, 2013; BETTIO *et al.*, 2014).

Na presença de estresse oxidativo, a constituição rica em lipídios do cérebro favorece a peroxidação lipídica, com produção de moléculas tóxicas como malondialdeído (MDA), que resulta em diminuição da fluidez da membrana e danos em proteínas de membrana, inativando receptores, enzimas e canais iônicos (BOUAYED; RAMMAL; SOULIMANI, 2009; KIM *et al.*, 2016; WIGNER *et al.*, 2018). Como resultado, o estresse oxidativo pode alterar a neurotransmissão, a função neuronal e a atividade cerebral geral (CHAVES *et al.*, 2019).

Dentre os sistemas antioxidantes (Figura 05), destacam-se superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutatona reduzida (GSH). Estas, podem neutralizar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. A SOD é uma das principais enzimas antioxidantes em mamíferos e catalisa a dismutação do radical ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este e outros peróxidos são convertidos em produtos não tóxicos pela ação da catalase e glutatona peroxidase (GPx) (ER *et al.*, 2007; MAES, 2011).

Figura 5 – Mecanismos de defesa antioxidante



Fonte: Chaves (2019)

O GSH um dos mais importantes tripeptídeos e um importante antioxidante intracelular não enzimático que é conhecido por participar da remoção de radicais livres, como H_2O_2 , ânions superóxidos e radicais alcoxi, manutenção de tióis protéicos de membrana e um substrato para glutatona peroxidase e glutatona redutase (NAIK, THAKARE, PATIL, 2011). Acredita-se que as alterações no sistema antioxidante sejam responsáveis pelo desenvolvimento de condições neurológicas, incluindo comportamento depressivo (JESULOLA, MICALOS, BAGULEY, 2018).

Estudos anteriores mostraram que repetidas administrações de glicocorticoides aumentaram marcadores pró oxidantes, tais como os envolvidos na peroxidação lipídica (malondialdeído e nitrito) com subsequente declínio da atividade de enzimas antioxidantes (catalase e glutatona redutase e peroxidase) no cérebro. Isso sugere que os hormônios do estresse têm uma relação causal com os processos oxidativos e seus efeitos deletérios (VARGAS *et al.*, 2013).

Além disso, a análise dos efeitos potenciais de novos compostos sobre os danos oxidativos induzidos pelo aumento da atividade de GC em correlação com a resposta comportamental pode fornecer o possível modo de ação e manter implicações importantes para intervenções terapêuticas (GUPTA, RADHAKRISHNAN, KURHE, 2015).

1.3 Tratamento da depressão

Diversas modalidades têm evidência de eficácia no tratamento de DM. Estas incluem: intervenções comportamentais, tais como: prática de exercícios físicos, sono controlado e alimentação saudável, além de psicoterapia em suas diversas formas e intervenções psicofarmacológicas (VASCONCELOS, 2015).

1.3.1 Abordagem farmacológica da depressão

Atualmente, medicamentos de classes diferentes são utilizados no tratamento da depressão. Embora não haja tanta diferença quanto a eficácia, destacam-se como mais utilizados, os medicamentos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) e atípicos. Estes, têm preferência em relação aos inibidores da monoaminoxidase (IMAO) e antidepressivos tricíclicos (ATC) devido à menor incidência de efeitos colaterais e à redução do risco de mortalidade em situações de overdose, embora tenham maior custo (HAWTON *et al.*, 2010; GARTLEHNER *et al.*, 2008).

Quadro 1 – Principais representantes antidepressivos segundo classes farmacológicas

CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS	PRINCIPAIS REPRESENTANTES
Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS)	Fluoxetina, paroxetina, sertralina, fluvoxamina, citalopram e escitalopram
Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (ISRSN)	Venlafaxina, desvenlafaxina e duloxetina
Atípicos	Bupropiona e mirtazapina
Inibidores da MAO	Tranicilpromina e fenelzina
Tricíclicos	Amitriptilina, nortriptilina, clomipramina.

Fonte: Autoria própria adaptada do estudo de Bentley, Pagalilauan, Simpson (2014).

De forma geral, o tratamento tem sido realizado por meio de monoterapia ou pela combinação com outras modalidades de atendimento (FOURNIER, 2010). Além disso, os

efeitos não são observados prontamente. Cerca de um terço dos pacientes requerem dez semanas de tratamento para o início de resposta (RUSH, 2007; BLIER, El MANSARI, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2014). Devem ser considerados os ajustes de dose e escolha da melhor classe em situações especiais, tais como insuficiência renal e hepática, gravidez e/ou lactação (BENTLEY, PAGALILAUAN, SIMPSON, 2014).

Entre os ISRS, a fluvoxamina (Flu) tem seu uso bem descrito na literatura, sendo utilizada há muitos anos no tratamento da depressão, inclusive das depressões severas, dos transtornos de ansiedade, incluindo o transtorno obsessivo-compulsivo, a ansiedade generalizada, a fobia social, o transtorno de estresse pós-traumático e os estados mistos de ansiedade e depressão, além da depressão maior com ansiedade comórbida (LAWS *et al.*, 1990; OTTEVANGER, 1991, SONAWALLA *et al.*, 1999; MUNDO *et al.*, 2001; DEL PORTO, 2007). Estudos anteriores demonstraram sua eficácia na restauração dos níveis de monoaminas (DEAR; BATEMAN, 2016), na estimulação da atividade da neurotrofina, como o BDNF (CAI, HUANG, HAO, 2015) e no estresse oxidativo (DALLÉ *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2015). Tais achados também foram observados no modelo de depressão induzida por corticosterona (VASCONCELOS *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2016; CAPIBARIBE, 2018; LOPES *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*, 2019), justificando seu uso neste estudo.

Os antidepressivos podem causar uma série de efeitos adversos, entre eles: náuseas, vômitos, diarreia e dor de cabeça, sendo que estes tendem a se resolver com o tempo. Em contrapartida, podem causar ganho ou perda de peso, fadiga e disfunção sexual de forma mais crônica. Em geral, os pacientes devem estar preparados para início imediato dos efeitos adversos com demora dos efeitos terapêuticos (GHARBIA, 2015).

Considerando o ISRS, observa-se também a ocorrência de hiponatremia, queda e fraturas. Estas últimas ocorrem devido a uma diminuição da mineralização óssea. Também deve haver cautela no uso de múltiplos antidepressivos por causa do risco de síndrome serotoninérgica (MOURA *et al.*, 2014; EDWARD, BOYER, 2005).

Infelizmente, aproximadamente 30% a 40% dos pacientes não respondem à primeira linha de tratamento. A depressão resistente ao tratamento (DRT), por definição, é a incapacidade de responder a doses adequadas e duração da terapia de dois diferentes antidepressivos de duas classes. Por isso, torna-se necessário obter um histórico completo do paciente, incluindo as informações: número de episódios depressivos, comorbidades

psiquiátricas, uso de substâncias, histórico do uso de antidepressivos, como dose, duração do tratamento (SOUERY, PAPAKOSTAS, TRIVEDI, 2006).

Diante do exposto, observa-se a necessidade da busca de novas substâncias que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes, apresentando menor índice de efeitos adversos, diminuindo o número de recidivas e sendo eficazes mesmo nos casos de depressão resistente.

1.4 Modelos animais de depressão

Os modelos animais são ferramentas fundamentais para o estudo de doenças humanas, como a depressão. Entretanto, pode ser desafiador estudar “depressão” em animais. Portanto, é necessário selecionar as medidas qualitativas em roedores indicativas de depressão em humanos, já que os sintomas da depressão humana são frequentemente subjetivos, variáveis e, às vezes, contraditórios. É importante salientar que alguns sintomas não podem ser medidos em animais de laboratório, como as ideias suicidas, por exemplo (WILLNER, 2005; QUIAO *et al.*, 2014).

Alguns modelos animais tem sido desenvolvidos com o intuito de determinar a influência do estresse no desenvolvimento da depressão, tais como: modelos do estresse crônico moderado, modelo do estresse crônico imprevisível e modelo da administração de corticosterona, sendo este último escolhido para o presente estudo (WILLNER, 1997; KIM, HAN, 2006; ZHAO, 2008; SHYTI *et al.*, 2015).

Em roedores, vários estudos mostraram que repetidas injeções de corticosterona (Cort) induziram aspectos comportamentais e neuroquímicos da depressão, incluindo efeitos sobre a neurogênese (ZHAO, 2008; PITTA *et al.*, 2013; MAO *et al.*, 2012; SHITY *et al.*, 2015), o metabolismo cerebral de monoaminas (INOUE; KOYAMA, 1996) e aumento da depressão verificado em testes comportamentais, tais como o teste de nado forçado e o teste de suspensão da cauda (MARKS, FOURNIER, KALYNCHUK, 2009, LIJIMA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013). Com base nestes estudos, foi possível concluir que esse modelo animal é válido para o estudo da etiologia da depressão e para avaliar a eficácia de medicamentos antidepressivos (STERNER, KALYNCHUK, 2010), tendo sido apontado inclusive como um modelo animal de depressão resistente ao tratamento (CALDARONE, ZACHARIOU, KING, 2014).

1.5 Riparina III

Atualmente os produtos naturais tem sido alvo de diversos estudos por apresentarem grande potencial como fonte de novos fármacos (CARLSON, 2010) e, portanto, sendo alvo da indústria farmacêutica (VIEGA JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

Figura 6 – Folha da *Aniba Riparia*

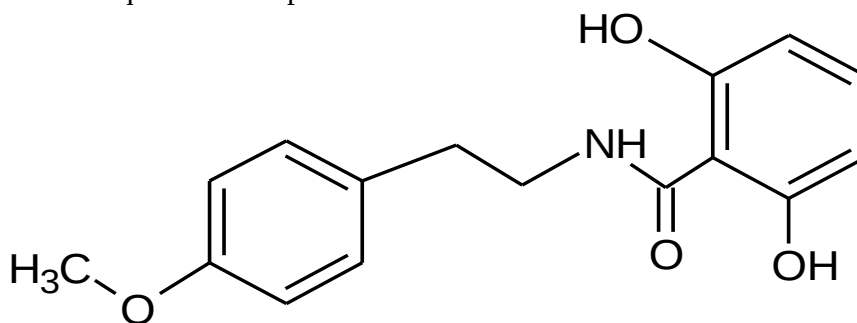


Fonte: Disponível em:

<<http://testweb.science.uu.nl/Amazon/VTGG/Lauraceae/Aniba/slides/Aniba%20riparia%201.html>>. Folha de *Aniba Riparia*.

A riparina III (Rip III), inicialmente isolada do fruto verde de *Aniba riparia* Ness Mez e, posteriormente sintetizada por Barbosa-Filho *et al.* (1990), é uma alcalamida natural, que constitui uma classe especial de alcaloides, contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza (CATÃO *et al.*, 2005). É considerada um composto bioativo, sendo formada da união da tiramina com o ácido benzoico. Apresenta duas substituições no anel do ácido benzoico, acrescentando duas hidroxilas. Além disso, o anel da tiramina apresenta um metil ligado ao oxigênio, formando uma função éter (FIGURA 07).

Figura 7 – Estrutura química da riparina III



Fonte: Catão (2005). Riparina III – Éter metílico de n-2,6-diidroxi-benzoil-tiramina.

Estudos prévios mostraram algumas propriedades farmacológicas da riparina III. Entre elas, pode-se mencionar a ação antimicrobiana contra bactérias gram positivas (*S. aureus*) e gram negativas (*E. coli*) (CATÃO *et al.*, 2005), além de efeitos espasmolíticos (THOMAS *et al.*, 1994) e efeitos hipotensor e bradicárdico transitório (SEIXAS, 1996).

Além desses efeitos periféricos, Rip III, em estudos pré-clínicos realizados no laboratório, apresentou ação sobre o sistema nervoso central, com atividade ansiolítica em modelos animais de ansiedade como o labirinto em cruz elevado e o teste da placa perfurada (SOUSA *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2006), com ação antidepressiva em modelos de estresse como o nado forçado e teste da suspensão da cauda (SOUSA *et al.*, 2004; MELO, 2012). Também apresentou um possível efeito sedativo-hipnótico e efeito anticonvulsivante em modelo de tempo de sono induzido por pentobarbital, assim como convulsões induzidas por pentilenotetrazol, respectivamente (SOUSA *et al.*, 2004).

Posteriormente aos achados acima identificados, o efeito antidepressivo da Rip III foi melhor analisado com o intuito de descobrir o mecanismo de ação envolvido. Então, com a utilização de antagonistas específicos, foi observado que a riparina III apresentou efeitos antidepressivos no teste do nado forçado e seu efeito parece estar envolvido com a modulação dos sistemas noradrenérgico (alfa 1 e alfa 2), serotoninérgico e dopaminérgico (D2) (MELO *et al.*, 2011; MELO, 2012; MELO *et al.*, 2013), sem apresentar qualquer alteração no teste do campo aberto (MELO *et al.*, 2011; MELO, 2012).

Em seguida, foram iniciados os estudos no modelo de depressão induzido por corticosterona. Rip III apresentou atividade antidepressiva evidenciada pelo teste do nado forçado, suspensão da cauda e preferência pela solução de sacarose; atividade ansiolítica demonstrada pelo teste do labirinto em cruz elevado e teste do campo aberto; diminuição do

isolamento social, demonstrado pelo teste de interação social; preservação da memória de trabalho, evidenciada pelo teste do labirinto em y; recuperação do filtro sensorio motor, demonstrada pelo teste de inibição pré pulso, sem alterar atividade locomotora no campo aberto). Além disso, Rip III restaurou os níveis de BDNF no hipocampo de camundongo estressados (VASCONCELOS, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Sua toxicologia pré-clínica também foi determinada por intermédio de citotoxicidade utilizando MTT (Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), CAN (Ácidos Nucleicos Totais) e CVN (Captação do Vermelho Neutro). Não foram observadas alterações no citoplasma nem no núcleo das células tratadas com as riparinas que sugerissem morte celular por apoptose ou necrose. A Rip III não causou perda da integridade da membrana celular, não induziu fragmentação do DNA nem promoveu parada no ciclo celular, sendo considerada uma substância de baixa toxicidade (SILVEIRA, 2007).

Considerando a evolução dos resultados e o potencial antidepressivo dessa substância, ficou demonstrada a necessidade em prosseguir com os estudos afim de elucidar através de quais vias da depressão essa substância exerce seus efeitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar as possíveis vias envolvidas no efeito antidepressivo da riparina III no modelo do estresse induzido pela administração de corticosterona em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

Investigar, em camundongos submetidos ao modelo de estresse induzido pela administração de corticosterona, os seguintes parâmetros:

- Avaliar a atividade antidepressiva da Rip III através do teste do nado forçado;
- Avaliar a atividade ansiolítica da Rip III através do teste da placa perfurada;
- Avaliar o efeito da Rip III na preservação da memória de curto e longo prazo através do teste da esquiva passiva;
- Analisar o efeito da Rip III nos níveis de monoaminas e seus metabólitos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no corpo estriado;
- Determinar o efeito da Rip III nos níveis de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ ;
- Avaliar potenciais efeitos neuroprotetores através da determinação dos parâmetros de estresse oxidativo: glutatona reduzida, superóxido dismutase e catalase, malondialdeído e a produção de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado;
- Determinar o efeito de Rip III na expressão de ERK e AMPA no hipocampo através da técnica de *western blotting*.

3 MÉTODOS

Trata-se de um estudo realizado no Laboratório de Neurofarmacologia (LNF), do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da Universidade Federal do Ceará, sob orientação da Professora Doutora Francisca Cléa Florenço de Sousa. O estudo foi iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal, número 13/2014 e 06/2017.

3.1 Material botânico

A planta *Aniba Riparia* (Nees) Mez foi identificada pelo botânico Klaus Kubtzky da Universidade de Hamburgo/Alemanha. As frutas verdes da *Aniba Riparia* foram coletadas pelo Dr. Hipólito F. Paulino-Filho (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) na região de Humaitá, estado do Amazonas, no Brasil (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). Estas foram cedidas ao Professor Dr. José Maria Barbosa-Filho do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (VASCONCELOS, 2015).

A extração, isolamento e posterior síntese da substância foram feitos por Stanley Juan Chavez Gutierrez sob a orientação do Professor Dr. José Maria Barbosa-Filho que gentilmente cedeu a substância isolada, colaborando imensamente para o desenvolvimento desta investigação científica.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos swiss, fêmeas, pesando entre 18 e 22g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, com ciclo claro/escuro alternado de doze horas, com luzes acesas às seis horas, recebendo ração padrão tipo purina e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais seguiram os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3 Drogas utilizadas

Todas as substâncias a seguir foram administradas num volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal.

- CORT (20 mg/kg, por via subcutânea (sc), Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvida em solução salina, contendo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,1% de Tween 80.
- Rip III (50 mg/kg, via oral (vo), Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, João Pessoa-PB, Brasil) foi dissolvida em 2% de Tween 80 e diluídas em água destilada. A escolha da dose utilizada foi determinada por meio de curva dose-resposta realizada por Melo (2012).
- Flu (50 mg/kg, via oral) foi diluída em água destilada com os mesmos critérios de Rip III.

3.4 Protocolo experimental e tratamento dos animais

Para este estudo, utilizou-se como modelo de depressão o estresse induzido pela administração de corticosterona. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=10 animais/grupo), sendo eles:

Grupo Controle: os animais receberam 21 dias de administração SC de salina, sendo que nos 7 últimos receberam também água destilada VO;

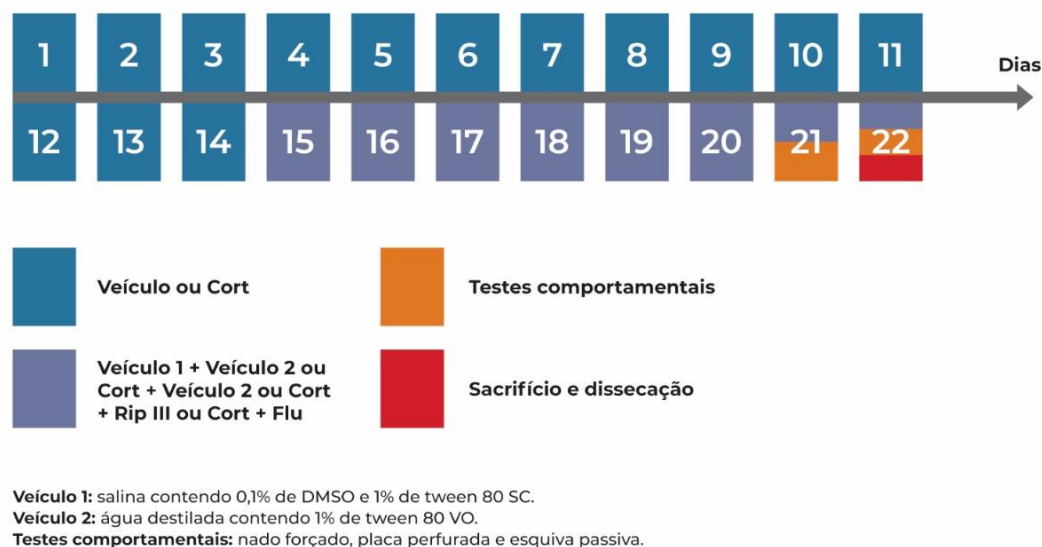
Grupo Cort (estressado): os animais receberam durante 21 dias administração de corticosterona SC.

Grupo Cort + Rip III: os animais receberam 21 dias de administração de Cort SC, sendo que nos 7 últimos receberam também Riparina III VO.

Grupo Cort + Flu: os animais receberam 21 dias de administração de Cort SC, sendo que nos 7 últimos receberam também Flu VO.

O procedimento de tratamento (Figura 8) foi realizado conforme descrito no estudo de Zhao e colaboradores (2008). Este foi repetido por diversas vezes para evitar que um mesmo animal fosse submetido a diversos testes.

Figura 8 – Esquema de tratamento



Fonte: Adaptado de Capibaribe (2018).

Ao final do tratamento do 22º dia, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de Nado Forçado (TNF), Placa Perfurada (TPP) e Esquiwa Passiva (TEP). Em seguida, foram sacrificados e dissecados para retirada das áreas cerebrais Córtex Pré Frontal (CPF), Hipocampo (HIP) e Corpo Estriado (CE) para a realização de testes neuroquímicos.

As regiões dissecadas foram colocadas em *eppendorffs* devidamente identificados, pesados e conservados a -70°C para uso posterior. As áreas foram estocadas durante um período de no máximo 2 meses, e, quando utilizados, os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação daqueles que foram ensaiados imediatamente ou 24h após a dissecação.

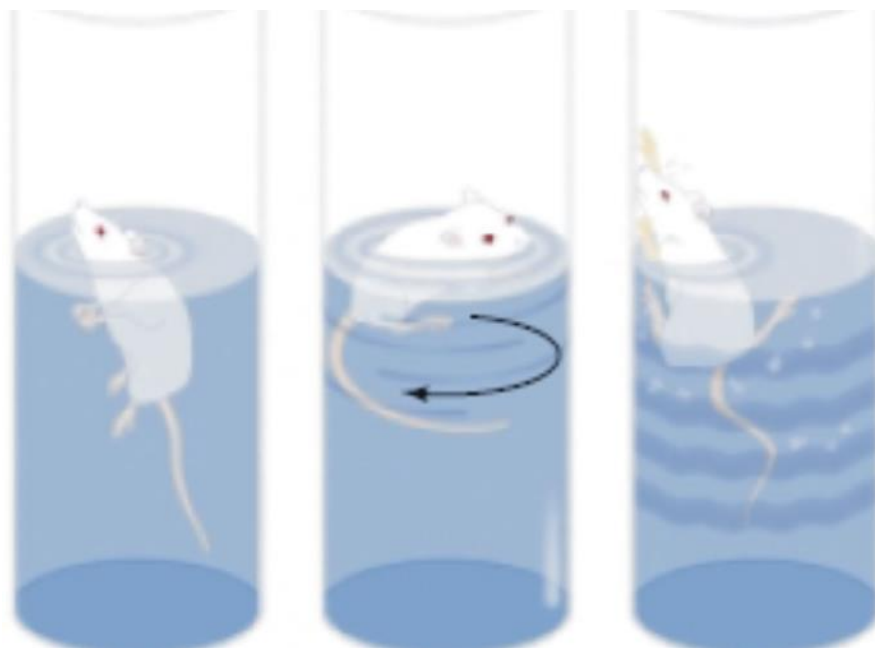
3.5 Testes comportamentais

3.5.1 Teste do nado forçado

Esse teste foi utilizado para avaliar a indução da depressão e atividade antidepressiva da Rip III. Os camundongos foram forçados individualmente a nadarem num recipiente cilíndrico aberto (diâmetro, 22 cm; altura, 40 cm) que continha 20 cm de água a $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Nesse teste, dois parâmetros foram avaliados: o tempo total durante o qual o camundongo permaneceu imóvel e o tempo de tentativas de escaladas (*climbing*) durante um

período de 5 minutos. A imobilidade foi definida como o animal flutuando na água sem se debater e fazendo apenas movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água. Como escalada foram considerados movimentos rápidos dos membros anteriores, de tal forma que as patas dianteiras quebram a superfície da água. Um aumento na duração da imobilidade e diminuição das tentativas de escaladas são indicativos de comportamentos depressivos (PORSOLT *et al.*, 1977; YANKELEVITCH-YAHAV, 2015).

Figura 9 – Aparato e parâmetros avaliados no Teste do Nado Forçado



Fonte: Adaptada de Vasconcelos (2015). A figura mostra o aparato utilizado no teste do nado forçado e os três tipos de comportamento que o animal exibe no teste: imobilidade, natação e escalada, respectivamente.

3.5.2 Teste da placa perfurada

Esse teste foi utilizado para avaliar a atividade ansiolítica da Rip III. O aparato da placa perfurada consiste de um painel com dezesseis furos equidistantes de 3 cm de diâmetro no chão (Figura 07). O aparelho não tem paredes e, para o teste, foi elevado a uma altura de 18 cm acima do nível do piso. Cada animal foi colocado sozinho no centro do tabuleiro de costas para o observador e durante 5 min foi determinado pela contagem o número total de mergulhos da cabeça (BOISSIER, 1962), sendo que o aumento dessa atividade prediz atividade ansiolítica.

Figura 10 – Aparato utilizado no teste da placa perfurada



Fonte: <http://www.otoenvironmental.com/holeboardapparatus>. Acesso em 22/05/2019.

3.5.3 Teste da esquiva passiva

Esse teste foi utilizado para avaliar a memória aversiva de curto e longo prazo dos animais, sendo baseado em reforço negativo e usado para avaliar memória de curto prazo (*short-term memory*) e memória de longo prazo (*long-term memory*).

O aparelho consiste numa caixa (31 cm de comprimento, 27 cm de altura e 24 cm de largura) com uma parede de vidro frontal; o piso consiste de uma série de barras paralelas de aço inoxidável espaçadas de 0,8 cm e conectadas a um gerador (Figura 08). A extremidade esquerda da grade é coberta por uma plataforma fórmica não condutora (plataforma de segurança).

Como os animais têm uma tendência em desenvolver atividade exploratória, primeiramente, cada animal foi colocado durante 1 min para percorrer livremente todo o aparato. Em seguida, foram retirados para posterior treinamento.

O treinamento é executado em duas sessões semelhantes. Primeiro, cada camundongo foi colocado na plataforma de segurança, registrando o tempo de descida do animal com suas quatro patas na grade (tempo de latência descendente), quando um choque (0,5 mA: 1s) foi aplicado. O animal foi então removido do aparelho. A segunda sessão foi realizada 90 minutos após o primeiro teste.

Para avaliação da preservação da memória curta foi realizada uma nova sessão e o tempo de latência da posição inicial para a região promotora do choque foi registrado dentro de

um tempo total de 300s. Após 24 horas, esse procedimento foi repetido para avaliação da memória de longo prazo. (JOSHI; PARLE, 2006). Um maior tempo de latência é indicativo de maior preservação.

Figura 11 – Aparato utilizado no teste de esquiwa passiva



Fonte: <http://insightltda.com.br/caixadeesquivapassiva>. Acesso em 22/06/2019.

3.6 Testes neuroquímicos

3.6.1 Dosagem de monoaminas

Para a determinação dos níveis de monoaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) ou CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido.

Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso

os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem. Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos. Neste estudo foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

Após a dissecação do corpo estriado, foram feitos homogenatos a 10% com ácido perclórico 0,1M (HClO₄) por 30s e, centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 mL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das monoaminas Noradrenalina (NE), dopamina (DA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 mm, da Shimadzu, Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada era composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69M, como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. Noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japan) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl (HALLMAN; JONSSON, 1984).

3.6.1.1. Soluções reagentes

Fase móvel

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, R.J., Brasil) e completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, R.J, Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, USA) e completado o volume para 471,5 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 8,5 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, USA) para um volume final de 500 mL.

Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20 ml de solução de NA, DA, 5-HT (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos 80 picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa *Microsoft Excel* e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

3.6.2 Avaliação do estresse oxidativo

A investigação da atividade antioxidante de Rip III foi realizada em homogenatos hipocampais, pré-corticais e estriatais utilizados nas determinações do estresse oxidativo - substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos níveis de nitrito/nitrato, da concentração de glutathiona reduzida (GSH), da atividade enzimática da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD).

3.6.2.1. Determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)

No método descrito por Beauchamp e Fridovich (1971), a quantidade de SOD é avaliada medindo sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Para a determinação dessa enzima, 1ml do meio reacional (tampão fosfato 50 mM, metionina 19,5 mM, EDTA 0,1 mM) foi adicionado ao homogeneizado e, na câmara fria, adicionaram-se 300µL de riboflavina 1 µM e 150µL de NBT 750 µM. A leitura foi realizada após a exposição do material à luz fluorescente por 15 min em um espectrofotômetro a 560 nm. A atividade enzimática é expressa em U/mg de proteína.

3.6.2.2 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

A determinação da GSH foi baseada no método descrito por (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Adicionou-se 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, potencial hidrogeniônico (pH) 8,9, a 400 µL do homogeneizado, acrescentando 20 µL de 5,5'ditiobis,ácido 2 – nitrobenzóico (DTNB) 0,01 M. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 412 nm e os resultados expressos em µg de GSH por g de tecido.

O homogenato a 10% das áreas cerebrais foi preparado em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02 M, em seguida foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 5000 rpm por 15 min.

Para a elaboração da curva de calibração, foram preparados 4 mL de soluções a 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/g. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4 M (pH 8,9). Adicionou-se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e foi feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB.

3.6.2.3 Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de lipoperoxidação foi medido pela determinação das concentrações de MDA determinado pelo ensaio do TBARS, de acordo com o método de (DRAPER; HADLEY, 1990). Este teste é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malondialdeído (MDA).

Os homogenatos das áreas cererais foram preparados a 10% utilizando solução de cloreto de potássio a 1,15%. Em seguida, 63 µL do homogenato com tampão fosfato foi misturado a 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, e depois aquecido num banho de água a ferver durante 30 min. 150 µL dessa mistura foi colocado nos poços da placa de ELISA e o conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micrograma de MDA por grama de tecido.

Para a elaboração da curva-padrão de MDA foram preparadas, as soluções a 0,627, 1,247, 2,463, 4,8, 9,16 e 16,77µg. O branco foi de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 535nm.

3.6.2.4 Determinação da produção de nitrito/nitrato

Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonilamida formando o sal diazônico. Este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com pico de absorbância em 546nm.

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pelo método proposto por (GREEN *et al.*, 1982). Em síntese, uma alíquota de 100 µl do homogeneizado foi incubada com 100 µl de reagente de Griess (1ml de ácido fosfórico 5% + 1ml de sulfanilamida 1 % em H₃PO₄ 5% + 1ml NEED 0,1 % + 1ml de água) à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância

foi medida em espectrofotômetro a 546 nm. A concentração de nitrito/nitrato foi expressa em nM/g de tecido, a partir da curva padrão.

Os homogenatos das áreas cerebrais foram preparados a 10% (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Para a elaboração da curva dose-resposta foram pesados 6,9 mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada. Em seguida foram feitas diluições seriadas ficando, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 nM e traçado a equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN et al., 1982).

3.6.2.5 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)

Segundo Chance e Maehly (1955), a atividade da CAT baseia-se na medida da taxa de produção de O_2 e H_2O na proporção em que o H_2O_2 , utilizado como substrato, é hidrolisado. A ação enzimática é medida pela leitura da alteração da absorbância durante 6 minutos e os resultados expressos em U/mg de proteína.

O procedimento experimental utilizou 980 μL do meio reacional (H_2O_2 , tampão Tris-HCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0 e água Milli-Q) com 20 μL de homogeneizado e a leitura foi feita em cubeta de quartzo em espectrofotômetro a 230 nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de (BRADFORD, 1976).

3.6.2.6 Dosagem de proteína pelo método de Bradford

O método de Bradford (1976) é baseado na interação do corante Coomassie Blue G250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de interação entre a proteína e o corante, ocorre o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve em 595nm.

Para a realização do experimento adicionou-se, aos poços da placa de ELISA, albumina (em concentrações crescentes e em duplicatas, para a realização da curva padrão), amostra (tampão utilizado no homogenato + amostra, o volume final deve ser 40 μL) e o branco (poços somente com o homogenato). Após preencher a placa foi acrescentado 200 μL da solução de Bradford diluída, esperou-se 5 minutos e foi feita a leitura em 595nm (BRADFORD, 1976).

3.6.3 Dosagem de citocinas

Para a análise de citocinas utilizou-se a citometria de fluxo, utilizando o kit Cythometric Bead Array (CBA) Th1/ Th2 / Th7 Cytokine Kit e seguindo as orientações do fabricante. A análise dos dados BD CBA foi realizada usando o software BD CBA ou FCAP Array. Foram dosadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ .

3.6.4 Determinação da expressão de ERK e AMPA por western blotting

A análise foi realizada segundo Custódio e colaboradores |(2017). Hipocampos (HC) foram homogeneizados em tampão de lise RIPA (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; NP40 1%; Triton X-100 a 1%; desoxicolato de sódio a 1%; SDS a 0,1%) com proteases inibidoras de fosfatase (1 μ L inibidor: 100 μ L RIPA). Para a extração de proteínas, as amostras de HC foram centrifugadas a 13.000 rpm por 17 min sob refrigeração (4° C) e o sobrenadante coletado. As concentrações de proteínas foram determinadas pelo modo de Bradford, de acordo com o protocolo do fabricante. A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (10%) foi realizada utilizando 50 μ g de proteína (previamente preparada com tampão de amostra Laemmli e aquecida a 95 ° C por 5 min). As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF, bloqueadas com BSA a 5% por 1 h e incubadas durante a noite com anticorpo primário de coelho anti-AMPA GluR1 IgG (1: 1000, ThermoScientific, EUA), anticorpo primário de coelho fosfo-Ser831-AMPA GluR1 IgG 1: 1000, ThermoScientific, USA), anticorpo primário IgG de coelho anti-p44 / 42 MAPK (Erk1 / 2) (1: 1000, Cell Signaling Technologies, EUA), coelho anti-fosfo-Thr202 / Tyr204-p44 / 42 MAPK (Erk1/2) anticorpo primário IgG (1: 1000, Cell Signaling Technologies, EUA) ou anticorpo primário IgG anti- α -tubulina de rato (1: 2000; SigmaAldrich, EUA). Após a lavagem, os blots foram incubados com anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase (1: 1000; Thermo Scientific, EUA) ou anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo (1: 1000; Thermo Scientific, EUA) por 90 min. O sinal foi detectado usando o sistema ECL (Bio-Rad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e, em seguida, as bandas foram capturadas com uma câmera CCD usando o sistema ChemiDoc (Bio-Rad, EUA). A quantificação por densitometria das bandas foi realizada com o software ImageLab Biorad.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados usando o software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EUA). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra (paramétrico ou não paramétrico). Foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey (*post hoc*), para resultados paramétricos, ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn's (*post hoc*), para os não paramétricos. Em todas as análises estatísticas, os valores foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) com valores significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados mostraram que Riparina III apresenta atividade antidepressiva, ansiolítica e na preservação da memória, bem como o seu possível envolvimento em todas as vias relacionadas às hipóteses da depressão, incluindo: modulação do eixo HHA e dos níveis monoaminas, além da atividade antioxidante e anti-inflamatória.

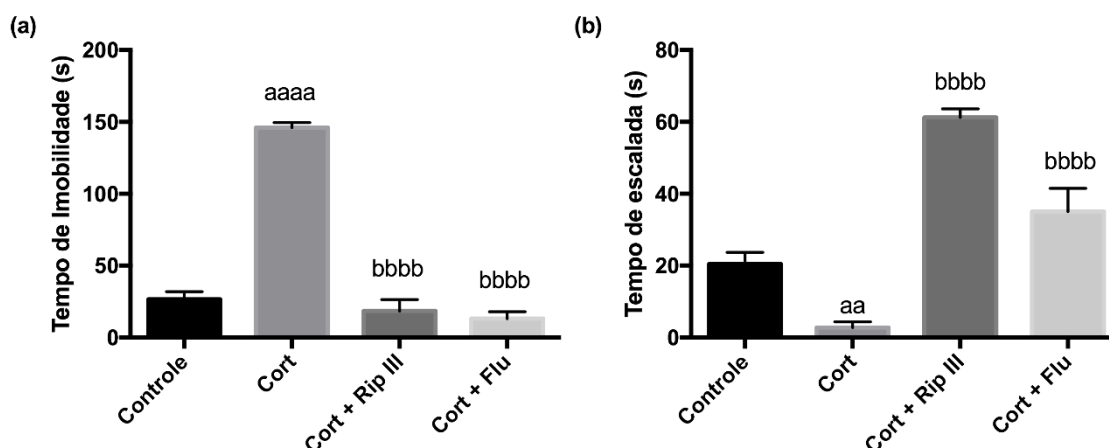
4.1 Testes comportamentais

Rip III demonstrou, através dos gráficos a seguir, atividade antidepressiva, demonstrada pelo teste do nado forçado; atividade ansiolítica, evidenciada pelo teste da placa perfurada e na restauração da memória curta, através do teste de esQUIVA passiva.

4.1.1 Teste do nado forçado

Através do teste do nado forçado foi possível verificar a atividade antidepressiva de Rip III, considerando os parâmetros de tempo de imobilidade (Gráfico 1a) e tempo de escalada (Gráfico 1b). O tratamento com corticosterona aumentou o tempo de imobilidade ($p < 0.0001$) e diminuiu o tempo de escalada ($p = 0.0056$) dos animais, entretanto, Rip III ($p < 0.0001$) e Flu ($p < 0.0001$) foram capazes de reverter essas alterações.

Gráfico 1 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, no (a) tempo de imobilidade e (b) tempo de climbing em camundongos no teste de nado forçado.

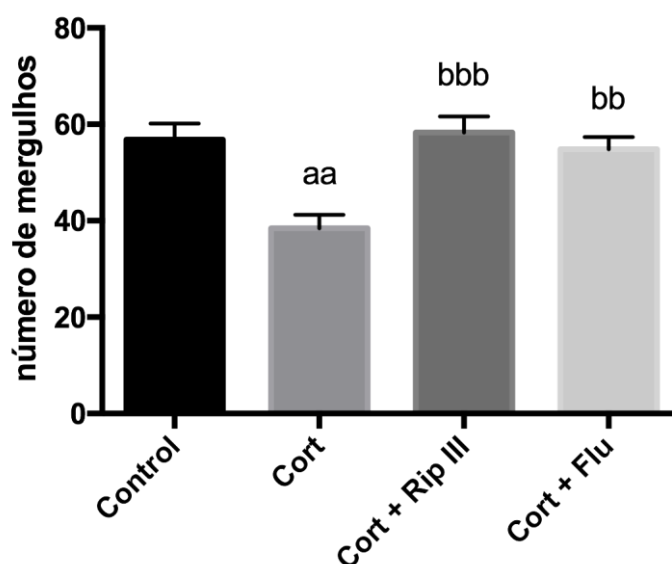


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 7$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ^{aaaa} $p < 0,0001$ vs controle, ^{bbbb} $p < 0,0001$ vs cort. Gráfico 1a: $F(3,24) = 107,3$. Gráfico 1b: $F(3, 24) = 39,1$.

4.1.2 Teste da placa perfurada

Através do teste da placa perfurada foi possível verificar que a corticosterona ($p=0.0012$) induziu ansiedade devido a diminuição do número de mergulhos realizados pelos animais, sendo este número revertido pelo tratamento com Rip III ($p=0.0005$) e Flu ($p=0.0038$).

Gráfico 2 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, no número de mergulhos em camundongos no teste da placa perfurada

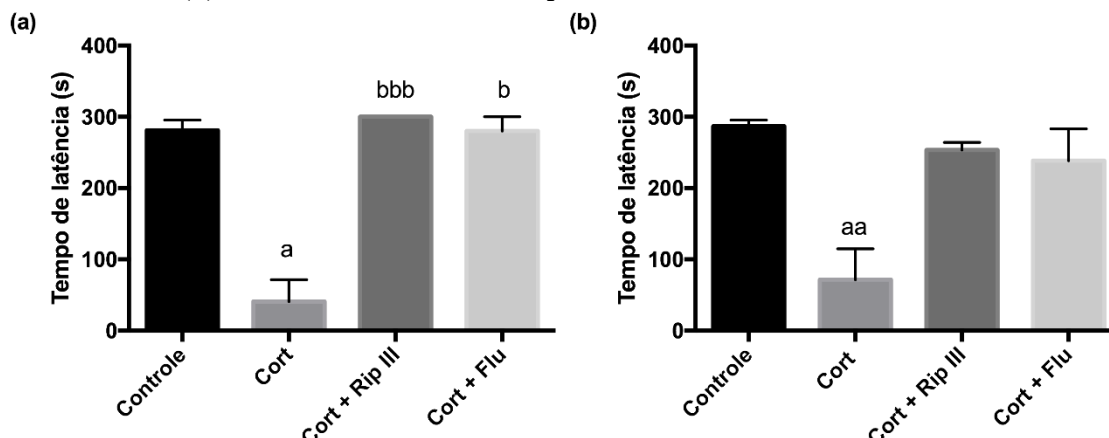


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 7$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ^{aa} $p < 0,01$ vs controle, ^{bb} $p < 0,01$, ^{bbb} $p < 0,001$ vs cort. $F(3,24) = 9.479$.

4.1.3 Teste de esquiva passiva

Através do teste de esquiva passiva foi possível verificar que a corticosterona promoveu comprometimento da memória de curto ($p=0.0115$) e longo ($p=0.0098$) prazo nos animais e os tratamentos com Rip III ($p=0.0006$) e Flu ($p=0.012$) reverteram o déficit de memória curta, demonstrado através do aumento do tempo de latência de deslocamento do animal em direção à região causadora de choque elétrico.

Gráfico 3 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, na reversão da perda de (a) memória curta e (b) memória tardia induzida por Cort.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 7$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. Valores significativos: ^a $p < 0,1$, ^{aa} $p < 0,01$ vs controle, ^b $p < 0,1$, ^{bbb} $p < 0,001$ vs cort.

4.2 Testes neuroquímicos

Riparina III apresentou-se como uma substância com efeito na modulação dos níveis de monoaminas, expressão de erk e ampa, ação antioxidante e antiinflamatória.

4.2.1 Níveis de monoaminas

Através da dosagem de monoaminas no corpo estriado dos animais, foi possível verificar que a corticosterona promoveu aumento significativo de NA ($p = 0.0443$), DA ($p = 0.0013$) e reduziu 5-HT ($p = 0.0487$), DOPAC ($p = 0.0472$) e HVA ($p = 0.0076$). Em contrapartida, o tratamento com Rip III foi eficaz em modular os níveis de NA ($p = 0.0037$), DOPAC ($p = 0.0299$), HVA ($p = 0.0233$) e 5-HT ($p = 0.0008$); e o tratamento com Flu, os níveis de 5-HT ($p = 0.0151$) e DA ($p = 0.0407$).

Tabela 1 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, na modulação dos níveis de monoaminas.

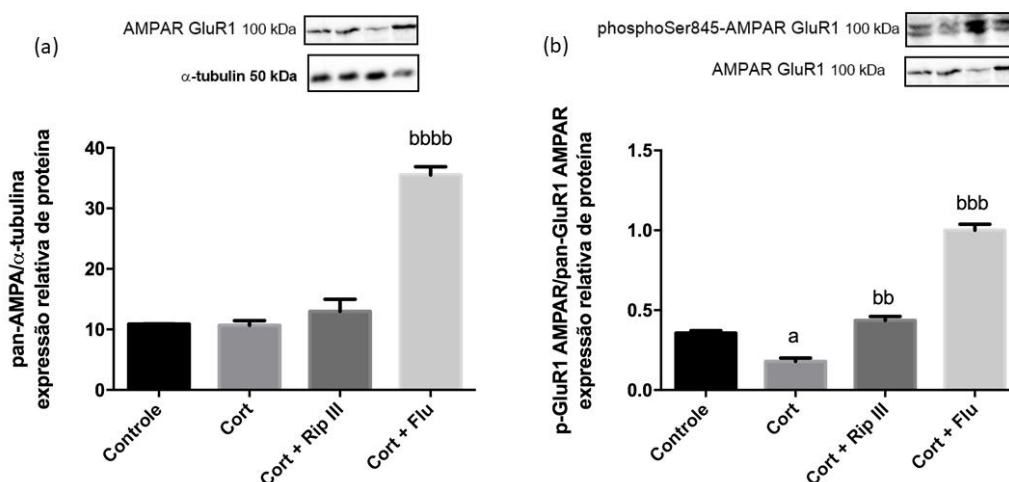
Área cerebral	Monoamina/ Metabólito	Controle	Cort	Cort + Rip III	Cort + Flu
Corpo estriado	Noradrenalina	4.309±0.621	7.369±0.6709 ^a	2.188 ±0.744 ^{bb}	4.662±1.387
	Dopamina	1.747±0.1685	6.903±0.6064 ^{aa}	2.727±0.8446	2.063±0.5129 ^b
	DOPAC	4.996±0.6852	1.833±0.1367 ^a	6.383±0.4776 ^b	2.560±1.008
	HVA	5.808±0.6646	1.986±0.2293 ^{aa}	6.313±0.126 ^b	2.735±1.205
	Serotonina	3.103±0.3757	1.597±0.3241 ^a	4.67±0.6555 ^{bbb}	3.666±0.3316 ^b
	5-HIAA	4.7±0.1900	4.147 ±0.5922	7.257 ±0.6296	7.32±2.12

Os resultados são expressos como a média ± EPM (n = 6 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para NA, 5-HT. A análise estatística foi determinada por Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's para DA, DOPAC, 5-HIAA, HVA. Valores significativos: ^ap <0,1, ^{aa}p <0,01 vs controle, ^bp <0,1, ^{bb}p <0,01, ^{bbb}p <0,001 vs cort. NA: F (3, 20) = 5,852; 5-HT: F (3, 20) = 8,07.

4.2.2 Expressão de AMPA

Foi possível verificar que a corticosterona promoveu diminuição a expressão de p-AMPA e os tratamentos com Rip III e Flu elevaram seus níveis.

Gráfico 4 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, na expressão de (a) AMPA total e (b) AMPA fosforilado

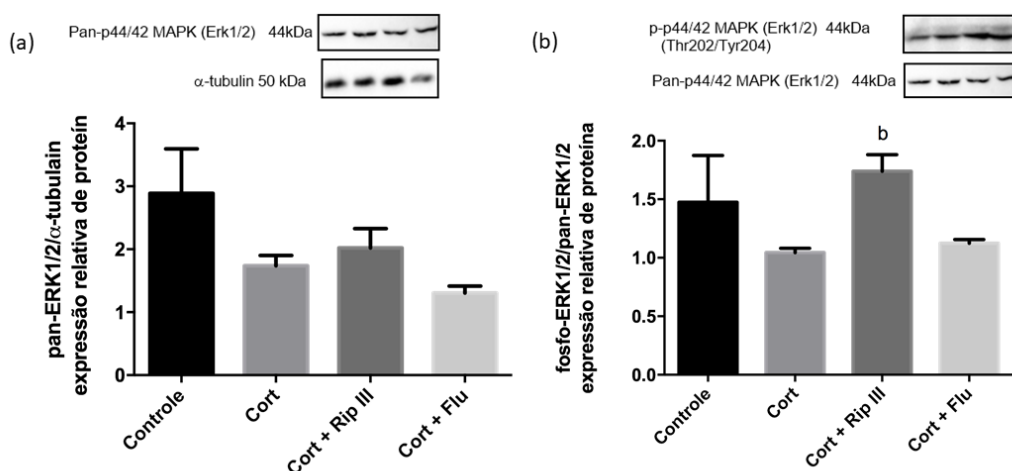


Os resultados são expressos como a média ± EPM (n = 4 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ^{aaaa}p <0,0001 vs controle, ^{bbbb}p <0,0001 vs cort.

4.2.3 Expressão de ERK

Foi possível verificar que a corticosterona mostrou tendência em diminuir os níveis de fosforilada, sendo estes aumentados significativamente pelo tratamento com Rip III.

Gráfico 5 – Efeito da Rip III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, na expressão de (a) ERK total e (b) ERK fosforilada



Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 5$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ^{aaaa} $p < 0,0001$ vs controle, ^{bbbb} $p < 0,0001$ vs cort.

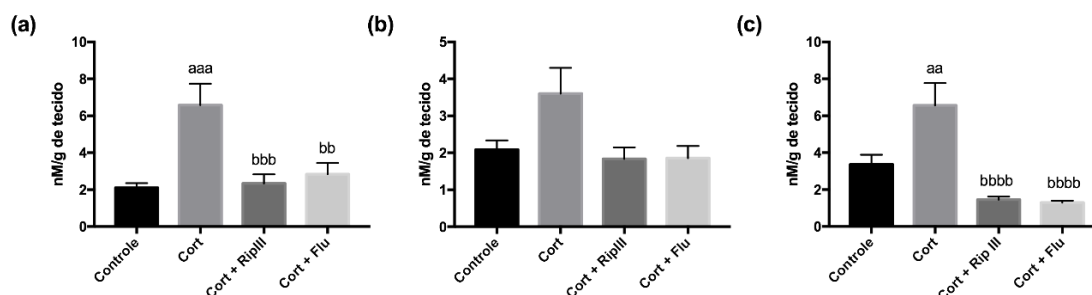
4.2.4 Estresse oxidativo

Através dos testes foi possível verificar que o tratamento com corticosterona induziu significativamente o aumento dos oxidantes nitrato e MDA e diminuição do antioxidante GSH, sendo que Rip III e Flu demonstraram reverter as alterações, apresentando-se como potenciais substâncias antioxidantes.

4.2.4.1 Níveis de nitrato/nitrato

O tratamento com corticosterona promoveu aumento significativo dos níveis de nitrato nas áreas cerebrais CPF ($p=0.0001$) e CE ($p= 0.0025$) e demonstrou tendência em aumentar os níveis no HIP. Em contrapartida, os tratamentos com Rip III e Flu reduziram significativamente esses níveis no CPF ($p=0.0004$; $p= 0.0018$) e CE ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$).

Gráfico 6 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, nos níveis de nitrito no (a) CPF, (b) HIP) e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona

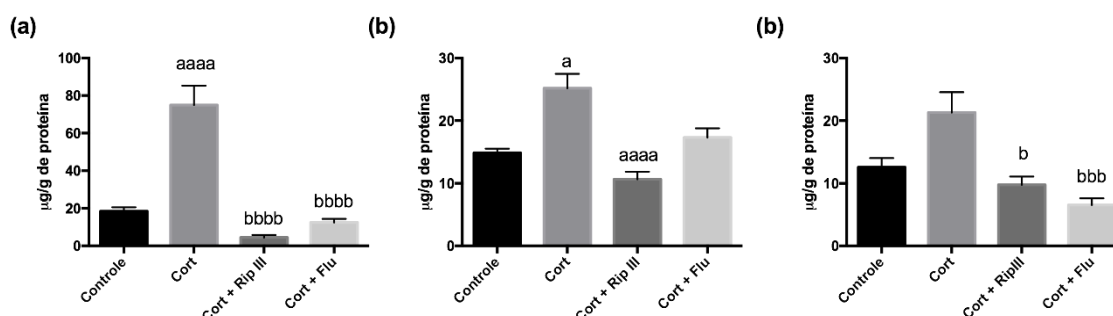


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para CPF e CE. A análise estatística foi determinada por Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's para HIP. Valores significativos: ^{aa} $p < 0,01$, ^{aaa} $p < 0,001$ vs controle, ^{bb} $p < 0,01$, ^{bbb} $p < 0,001$, ^{bbbb} $p < 0,0001$ vs cort. CPF: $F(3, 28) = 46,98$. CPF: $F(3, 28) = 10,19$; CE: $F(3, 28) = 17,37$.

4.2.4.2 Níveis de malondialdeído

O tratamento com corticosterona promoveu aumento significativo dos níveis de MDA nas áreas cerebrais CPF ($P < 0.0001$) e HIP ($p = 0.0002$) e demonstrou tendência em aumentar os níveis no CE ($p < 0.0103$). O tratamento com Rip III mostrou redução significativa desses níveis no CPF ($P < 0.0001$), HIP ($P < 0.0001$) e CE ($p = 0.0006$); e o tratamento com Flu, apenas em CPF ($P < 0.0001$) e HIP ($p = 0.0067$).

Gráfico 7 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, nos níveis de MDA no (a) CPF, (b) HIP) e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona.

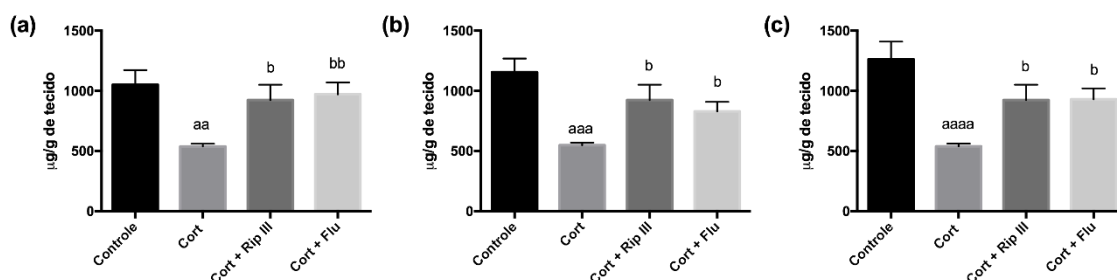


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para CPF. A análise estatística foi determinada por Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's para HIP e CE. Valores significativos: ^a $p < 0,1$, ^{aaaa} $p < 0,0001$ vs controle, ^b $p < 0,1$, ^{bbb} $p < 0,001$, ^{bbbb} $p < 0,0001$ vs cort. CPF: $F(3, 28) = 46,98$.

4.2.4.3 Níveis de glutathione redutase

O tratamento com corticosterona promoveu diminuição significativa dos níveis de GSH no CPF ($p = 0.0039$), HIP ($p < 0.0001$) e CE ($p < 0.0001$). Rip III (CPF: $p = 0.0384$; HIP: $p = 0.0199$; CE: $p = 0.0283$) e Flu (CPF: $p = 0.0099$; HIP: $p = 0.0429$; CE: $p = 0.0111$) reverteram as alterações nas três áreas cerebrais.

Gráfico 8 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, nos níveis de GSH no (a) CPF, (b) HIP) e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona.

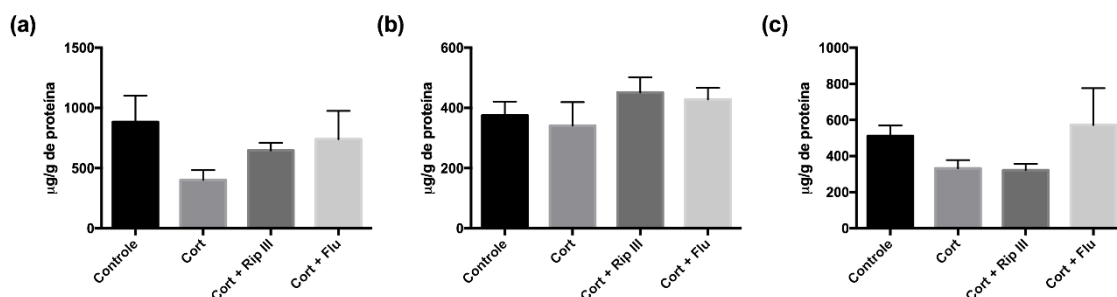


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para CPF. A análise estatística foi determinada por Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's para HIP E CE. Valores significativos: ^a $p < 0,1$, ^{aaaa} $p < 0,0001$ vs controle, ^b $p < 0,1$, ^{bbb} $p < 0,001$, ^{bbbb} $p < 0,0001$ vs cort. CPF: $F(3, 28) = 6,134$.

4.2.4.4 Atividade enzimática da Superóxido dismutase

O tratamento com corticosterona promoveu tendência em reduzir dos níveis de SOD nas três áreas cerebrais. Em contrapartida, Rip III mostrou tendência em restaurar esses níveis no CPF e HIP e Flu, no HIP e CE.

Gráfico 9 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, nos níveis de SOD no (a) CPF, (b) HIP) e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona.

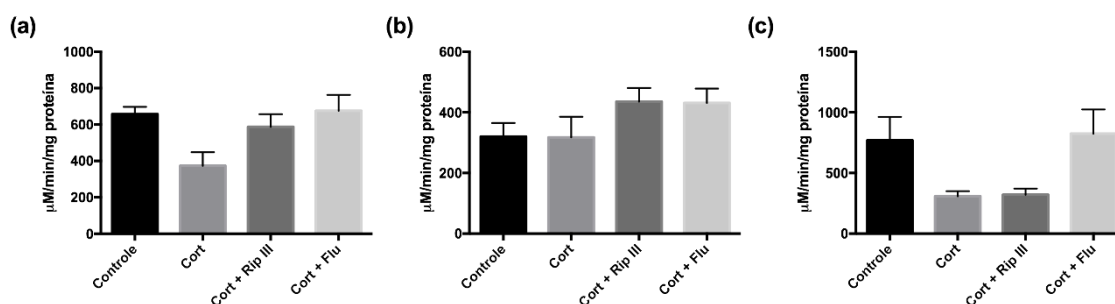


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 6$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

4.2.4.5 Atividade enzimática da catalase

O tratamento com corticosterona promoveu tendência em reduzir dos níveis de SOD nas três áreas cerebrais. Rip III mostrou tendência em restaurar esses níveis no CPF e HIP e Flu no CPF e CE.

Gráfico 10 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, nos níveis de catalase no (a) CPF, (b) HIP) e (c) CE de camundongos após o estresse pela administração de corticosterona.



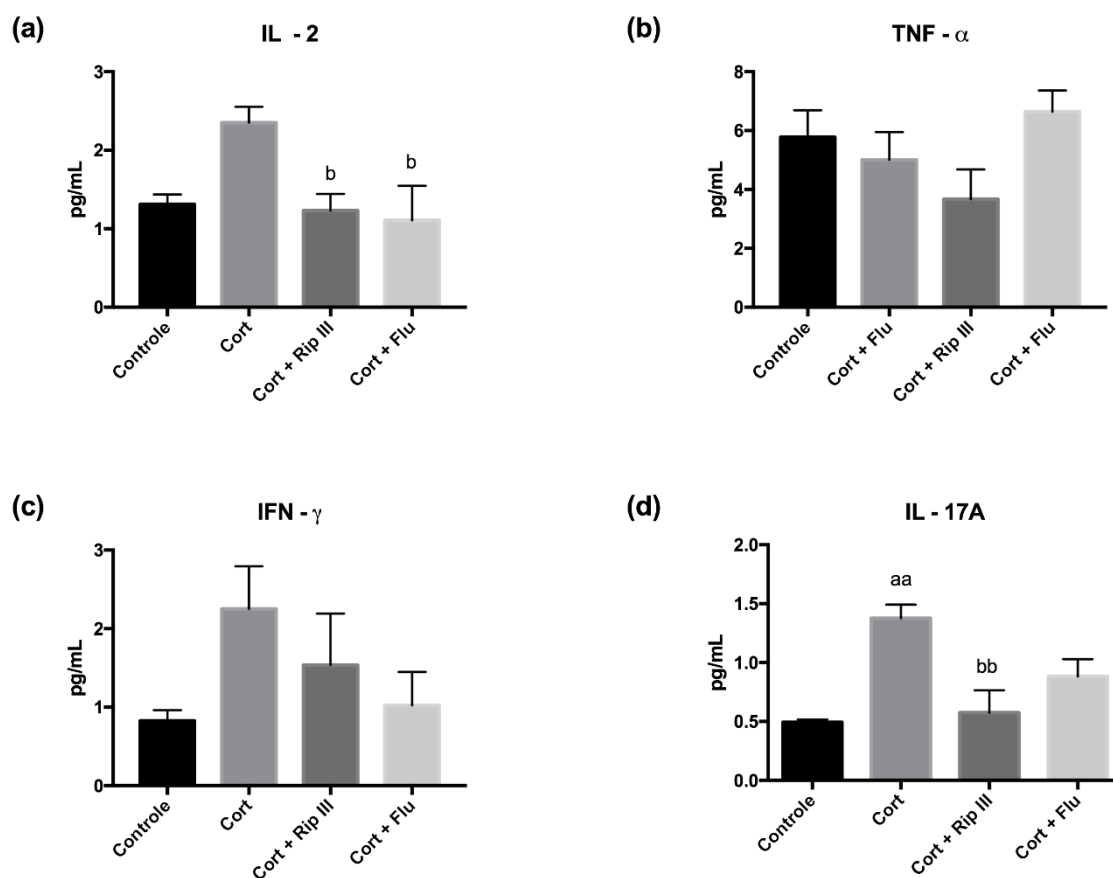
Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 6$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

4.2.5 Envolvimento das citocinas

4.2.5.1 Citocinas perfil Th1/Th17

A administração de corticosterona resultou em aumento de citocinas pró inflamatórias com perfil Th1/Th17 nos hipocampus dos animais, sendo significativo em IL-17 ($p = 0.0012$). O tratamento com Rip III promoveu redução de todas as citocinas estudadas, sendo estatisticamente significativa em IL-2 ($p = 0.044$) e IL-17 ($p = 0.0029$), enquanto que em Flu apenas para IL-2 ($p = 0.0235$).

Gráfico 11 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, nos níveis de citocinas do perfil Th1/Th17 (a) IL-2, (b) TNF- α , (c) IFN- γ , (d) IL-17.

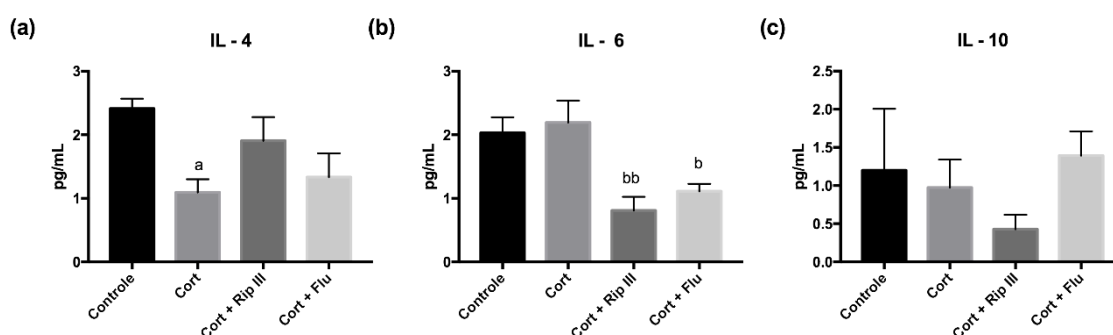


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 5$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para IL-2, IL17, TNF- α e IFN- γ . Valores significativos: ^{aa} $p < 0,01$ vs controle, ^b $p < 0,1$, ^{bb} $p < 0,01$. IL-2: $F(3, 16) = 4,492$; TNF- α : $F(3, 16) = 1,942$; IFN- γ : $F(3, 16) = 1,749$; IL-17: $F(3, 16) = 9,111$.

4.2.5.2 Citocinas perfil Th2

A administração de corticosterona resultou em alterações dos níveis de citocinas com perfil Th2 no hipocampo dos animais, apresentando aumento de IL-6 e redução de IL-4 e IL-10 com significância em IL-4 ($p=0.013$) e os tratamentos com Rip III ($p= 0.005$) e Flu (0.0292) demonstraram reverter os efeitos sendo significantes apenas em IL-6.

Gráfico 12 – Efeito da Riparina III (50mg/kg) e Flu (50mg/kg), via oral, nos níveis de citocinas do perfil Th2 (a) IL-4, (b) IL-6 e (c) IL-10



Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 6$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para IL-4 e IL-6. A análise estatística foi determinada por Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's para IL-10. Valores significativos: ^a $p < 0,1$, ^b $p < 0,1$, ^{bb} $p < 0,01$. IL-4: $F(3, 16) = 5,039$; IL-6: $F(3, 16) = 7,769$.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro a delinear as possíveis vias envolvidas no efeito antidepressivo da Riparina III. Como foi dito, a etiologia da depressão maior é multifatorial, podendo estar relacionada a uma gama de alterações neuroquímicas e, no presente estudo, os resultados mostraram que Rip III apresenta potencial farmacológico na seguintes aspectos: modulação dos níveis de monoaminas, elevação dos níveis de neurotrofinas, regulação dos níveis de citocinas e componentes do estresse oxidativo, sendo, portanto, uma droga inovadora para o mercado por apresentar diferencial em relação a terapia atual (baseada apenas na teoria das monoaminas).

Considerando os testes comportamentais, Rip III demonstrou atividade antidepressiva, ansiolítica e na preservação da memória. Para monitorar o comportamento depressivo, foi utilizado o teste do nado forçado, por este se basear no pressuposto de que a imobilidade reflete uma medida de desespero comportamental. É importante notar que essa imobilidade parece ser o resultado de uma incapacidade ou relutância em manter o esforço, em vez de uma hipoatividade generalizada (MELO *et al.*, 2011; ABELAIRA *et al.*, 2013).

Em estudos anteriores utilizando modelos agudo e crônico de depressão, Rip III já tinha mostrado resposta nesse parâmetro e em testes complementares, tais como o de suspensão da cauda e preferência pela solução de sacarose para avaliação da anedonia (SOUSA *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2015). No entanto, para este trabalho, foi levado em consideração também o parâmetro “*climbing*” ou escalada, que refere-se ao comportamento do animal de tentativa de fuga e seu aumento prediz atividade antidepressiva. Os comportamentos ativos (escalada e natação) poderiam potencialmente levar à fuga e, como resultado, diminuir o estresse (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015).

O TNF é considerado o teste comportamental mais importante na avaliação da atividade antidepressiva de drogas, sendo descrito como padrão ouro, principalmente considerando que as drogas mais utilizadas do mercado, tais como os ISRS, respondem a ele. (MELO *et al.*, 2011; ABELAIRA *et al.*, 2013; YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015).

A Rip III demonstrou atividade ansiolítica significativa através do teste da placa perfurada. Este, ganhou popularidade na avaliação da ansiedade, oferecendo um método simples para medir a resposta de um animal a um ambiente desconhecido. A atividade de mergulhar, parâmetro observado na avaliação, é inversamente proporcional ao estado de

ansiedade do animal. Inclusive, drogas utilizadas na terapia atual ansiolítica, tais como os benzodiazepínicos, respondem a esse teste. É importante salientar que o teste da placa perfurada não prediz a atividade ansiolítica por si só, entretanto corrobora com outros testes, como o labirinto em cruz elevado (LCE) e o campo aberto, que foram anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa em modelos agudo e crônico de depressão (SOUSA *et al.*, 2004; NETO *et al.*, 2008, VASCONCELOS *et al.*, 2015; SOUSA, OLIVEIRA, CALOU, 2018).

Dentre todas as comorbidades, a ansiedade é a mais frequente em pacientes depressivos e ambas são, por muitas vezes, tratadas com classes de medicamentos semelhantes. Por isso, em estudos uma sempre deve ser avaliada em concomitância com a outra (WANG *et al.*, 2019). O modelo de estresse utilizado no presente estudo mimetiza depressão associada a ansiedade (ZHAO, 2008).

O aprendizado e a memória são elementos importantes relacionados à plasticidade do SNC. É bem documentado na literatura a existência de déficit cognitivo em pacientes com depressão, tais como memória e a atenção (BAUNE, RENGGER, 2014), inclusive em situações de estresse crônico e uma certa melhora destes sintomas em pacientes tratados com os antidepressivos disponíveis (BAUNE *et al.*, 2012), embora estes ainda deixem muito a desejar nesse aspecto (OGREN, SVEN, STIEDL, 2013). Estudos sobre os efeitos crônicos de níveis elevados de glicocorticoides relacionaram a hipercortisolemia, depressão e memória (JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012; WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013).

O teste de esQUIVA passiva, utilizado para avaliar a memória aversiva e aprendizado dos animais através do medo, é importante na avaliação de drogas farmacologicamente ativas para distúrbios do sistema nervoso central. O teste leva em consideração a memória emocional curta e de longo prazo (24h), que está relacionada com hipocampo e amígdala. Os animais aprendem a evitar um choque elétrico inescapável e latências de retenção mais longas indicam uma melhor experiência aprendida (ULAK *et al.*, 2011; OGREN, SVEN, STIEDL, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Nossos resultados indicaram que Rip III diminuiu o comprometimento da memória de curto prazo em animais estressados pela corticosterona. A consolidação da memória é um processo no qual um traço de memória de curto prazo é transferido em uma de longo prazo estável. Entretanto, nem todas as informações são igualmente armazenadas a longo prazo. Sabe-se que experiências emocionalmente excitantes são bem lembradas, mesmo depois de décadas. A consolidação bem-sucedida da memória depende da síntese de novas proteínas e

de mudanças a longo prazo na plasticidade sináptica (QUERVAIN et al., 2009). Além disso, Marin, Raymond e Lupien (2019), reforçaram que em situações de estresse a memória mais afetada é a emocional.

Em Vasconcelos (2015), corroborando com os achados no presente estudo, também foi realizado o teste do labirinto em y ou *ymaze*. Este tem sido classicamente utilizado para avaliar a memória espacial de trabalho em curto prazo (DELLU *et al.*, 2000). Rahmadi et al (2014) mostraram que a mesma está comprometida em situações de estresse crônico, mas Rip III mostrou reverter também essas alterações, apresentando-se como uma substância promissora na preservação da memória.

Respondendo a teoria das monoaminas, neste trabalho ficou evidenciada a eficácia da Rip III na modulação dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico. É importante ressaltar que Melo et al (2011; 2013) também observaram esse efeito em modelo agudo de depressão.

Através da cromatografia, ficou demonstrado o efeito da corticosterona em aumentar os níveis de NA. A associação entre a administração de glicocorticóides em animais e níveis aumentados de NA tem sido documentada na literatura (MC REYNOLDS *et al.*, 2010; MELCHERT *et al.*, 2019), resultando em efeitos importantes, como a redução da neurogênese com perda de memória e o isolamento social, por exemplo (NICHOLSON *et al.*, 2014). Em Vasconcelos et al (2015), Rip III demonstrou efeito de melhora da interação social entre os animais e reverteu a redução dos níveis de BDNF, demonstrando atividade na neurogênese.

Nossos resultados também demonstraram que a administração de corticosterona elevou os níveis de dopamina e Rip III mostrou uma tendência em modular seus níveis. O neurotransmissor dopamina é um importante modulador da sinalização neuronal e ativação do circuito do estresse. A ativação dos circuitos dopaminérgicos cerebrais leva a alterações agudas e de longo prazo nas funções neurais. Dentre os estressores, destaca-se o uso crônico de glicocorticóides, pois sua administração pode aumentar a DA extracelular. Além disso, nas situações de estresse, várias regiões dopaminérgicas aumentam a expressão de receptores de glicocorticóides. O aumento da função da dopamina pode reduzir a atividade serotoninérgica promovendo hipervigilância nas situações de estresse (MARGIS *et al.*, 2003; STANWOOD *et al.*, 2019).

A serotonina tem grande importância na depressão e ansiedade associadas ao estresse. Este afeta vários aspectos da sinalização serotoninérgica no cérebro e, inversamente, os medicamentos serotoninérgicos podem modular os efeitos do estresse. O aumento crônico dos níveis de corticosteroides, como o estresse crônico, reduz a sinalização da serotonina no hipocampo (VAN DEN BUUSE, HALE, 2019). No presente estudo, a corticosterona também reduziu esses níveis, porém Rip III demonstrou restaurar as concentrações dessa monoamina.

Segundo Holmes (2008), a inervação serotoninérgica no córtex e outras estruturas cortico-límbicas estão envolvidas na regulação do humor e na resposta às diversas formas de estresse, incluindo o relacionado ao uso prolongado de glicocorticóides. O estudo de Dubey et al (2015) mostrou a associação entre hipercortisolemia e a redução da função do receptor 5-HT₁ e densidade do receptor 5-HT₂ e, drogas que modulam esse sistema, podem apresentar efeitos antidepressivos e ansiolíticos.

Além desses neurotransmissores, o glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, também tem importante participação no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória, na epilepsia, na isquemia neural, na ansiedade e na depressão (VALLI, SOBRINHO, 2014).

A literatura sugere o envolvimento dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) no mecanismo de ação de drogas antidepressivas. Essa evidência é bidirecional, já que o tratamento crônico com antidepressivos afeta a função dos receptores de glutamato de tal forma que antagonistas do receptor NMDA e moduladores alostéricos positivos do AMPA exercem efeitos semelhantes aos dos antidepressivos (ALT, WITKIN, BLEAKMAN, 2005). No presente estudo, ficou evidenciado que Rip III e Flu aumentaram a expressão de AMPA.

O receptor de AMPA tem um local modulatório alostérico que, ao ser ativado pode aumentar os níveis de BDNF e estimular a neurogênese *in vivo*. Embora os antidepressivos tradicionais já tenham essa atividade por outros mecanismos, o estímulo do receptor AMPA pode potencializar esse efeito.

O estudo de Szegedi e colaboradores (2011) mostrou que antidepressivos convencionais como a fluoxetina, modulam positivamente os receptores AMPA pela fosforilação da subunidade GluR. Em Wolak et (2013) imipramina e reboxetina aumentaram a expressão de AMPA, demonstrando que os antidepressivos com mecanismos de ação

noradrenérgica são dependentes da transmissão desse receptor. No caso de substâncias com relevância apenas na transmissão serotoninérgica, como o escitalopram, o estudo deixou claro que o bloqueio desse receptor não eliminou a atividade antidepressiva, mas um aumento na sua atividade consegue potencializar esse efeito.

Rip III demonstrou elevar a expressão de ERK no hipocampo. Um corpo crescente de evidências sugere que a via de sinalização mediada por ERK pode participar da fisiopatologia da depressão (EINAT *et al.*, 2003; FENG *et al.*, 2003; GOURLEY *et al.*, 2008; MANJI *et al.*, 2001). A ativação da ERK ocorre em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares e gera um caminho essencial para as células se adaptarem às mudanças no ambiente. Essas respostas celulares incluem: a regulação da expressão gênica e síntese de novas proteínas, alteração da estrutura ou metabolismo, crescimento, diferenciação e apoptose da célula (SHIFLETT, BALLEINE, 2011). A diminuição da expressão e ativação da ERK foi encontrada no cérebro *post-mortem* de indivíduos suicidas com depressão maior (DWIVEDI *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento prolongado com corticosterona em ratos diminuiu a fosforilação da ERK1/2 no hipocampo, sugerindo seu papel da ERK1/2 no estresse e na depressão (GOURLEY *et al.*, 2008).

Considerando a associação entre depressão e inflamação, ficou demonstrada a influência da Rip III no estresse oxidativo e nos níveis de citocinas.

As espécies reativas de oxigênio iniciam cascatas de sinalização em resposta ao estresse, modificando áreas redox específicas sensíveis como mecanismo regulador (WOJTOVICH, FOSTER, 2014). Assim, é importante estudar drogas farmacologicamente ativas em busca de um efeito antioxidante que promova uma redução dos danos teciduais (NUNES, 2015). Evidências pré-clínicas e clínicas indicam que espécies reativas de oxigênio prevalecem sobre os sistemas defensivos no cérebro no contexto de doenças psiquiátricas (SMAGA *et al.*, 2015).

No presente estudo, Cort promoveu danos cerebrais através do aumento dos níveis de nitrito/nitrato e malondialdeído, bem como através da redução dos níveis de catalase, SOD e, principalmente GSH. Rip III, por sua vez, foi capaz de reverter esses mecanismos na maioria das situações, trabalhando potencialmente como uma droga com propriedades antioxidantes. As outras riparinas, análogas estruturais da Rip III, também apresentam efeito antioxidante importante (OLIVEIRA, 2016, CAPIBARIBE, 2018, LOPES *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*,

2019). Entretanto, a presença de duas hidroxilas no anel aromático pode sugerir que Rip III tenha melhor efeito antioxidante.

O aumento do nitrito é um fator importante no contexto das doenças psiquiátricas, pois este pode induzir a clivagem do DNA nuclear (resultando em apoptose), favorecer a peroxidação lipídica, reduzir a função de receptores monoaminérgicos e aumentar a atividade da MAO (enzima responsável pela degradação de monoaminas). Cha et al (2016) sugeriram uma associação entre nitrito e neurotoxicidade, especificamente entre níveis aumentados e deficiência na memória e aprendizagem em roedores e substâncias antioxidantes poderiam diminuir esse comprometimento. Este resultado entra em concordância com os achados já citados dos estudos anteriores (labirinto em y e dosagem de BDNF) e atuais (esquiva passiva) sobre a farmacologia da Rip III.

Os altos níveis de MDA foram significativamente reduzidos após a administração de Rip III. Estes resultados sugerem, portanto, que ela pode exercer um efeito antioxidante que protege as biomoléculas lipídicas (SERAFINI *et al.*, 2011). Os estudos de Bilici et al (2001) e Sarandol (2007) mostraram que existe relação entre o número de aumentos de episódios depressivos e altas concentrações de MDA.

Os resultados da GSH são de extrema relevância, pois, como foi dito, esta é considerada um dos mais importantes agentes na defesa antioxidante, por prevenir dano neuronal indo pelas EROs. Como não foi observada significância na catalase, o resultado leva a conclusão de que o peróxido de hidrogênio produzido pela SOD teria sido detoxificado pela GSH. Portanto, assim como encontrado no modelo agudo de depressão em Melo (2012), “o aumento de GSH pode ter ocorrido por um mecanismo gerenciado por neurônios hipocampais, pré-corticais e estriatais, de alguma forma estimulados por Rip III para eliminar os radicais gerados por uma menor atividade da catalase”.

A administração de Cort induziu tendência em reduzir a atividade de SOD e CAT no HIP, no CPF e no CE. Lucca et al (2009) encontrou resultado semelhante nas mesmas áreas cerebrais em camundongos estressados, sugerindo que as alterações no sistema de defesa antioxidante endógeno são responsáveis pela indução de comportamento depressivo em camundongos. Rip III demonstrou tendência em restaurar os níveis das enzimas no CPF e no HIP. É interessante ressaltar que nem sempre a fisiologia do organismo responde com o funcionamento de todos os sistemas antioxidantes e essa tendência pode demonstrar um menor

funcionamento das enzimas SOD e CAT pelo fato de que GSH por si só conseguiu exercer esse efeito (THAKARE, DAKHANE, PATEL, 2016).

Estudos mostram que além das citocinas inflamatórias, o estresse oxidativo afeta negativamente a neuroplasticidade e neurogênese. A superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o radical superóxido ($O^{\bullet}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e espécies reativas de nitrogênio, como óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e peroxinitrito (ONOO), pode induzir a clivagem do DNA nuclear (promovendo a apoptose), favorecer a peroxidação lipídica, reduzir a função de receptores catecolaminérgicos e serotoninérgicos, além de aumentar a atividade da monoamino oxidase (MAO), enzima responsável pela degradação de monoaminas (WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013 apud CHAVES *et al.*, 2019).

Já é aceito que a administração antioxidante exógena pode ser usada no tratamento da depressão, dado que muitos antidepressivos sintéticos atualmente disponíveis apresentam baixas taxas de resposta, altas taxas de remissão e efeitos adversos graves (NESTLER *et al.*, 2002). Com relação a isso, a associação entre o estresse oxidativo e os mecanismos terapêuticos dos antidepressivos tem sido constantemente relatada (BILICI *et al.*, 2001; KHANZODE *et al.*, 2003; CUMURCU *et al.*, 2009; MELO, 2012; LOPES *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*, 2019). Sezini e Gil (2014) comprovaram a necessidade de suplementação com antioxidantes para pacientes vivendo em condições de estresse crônico, como é o caso de muitos pacientes depressivos. Neste contexto, Rip III parece ser uma droga promissora no tratamento da depressão, considerando também o seu potencial antioxidante.

Outro aspecto importante da DM é a associação com a inflamação, levantando a hipótese de que a mesma está freqüentemente relacionada a ativação do sistema imune com aumento de citocinas pró-inflamatórias, sendo IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α as mais relevantes, e diminuição de citocinas antiinflamatórias, tais como IL-4 e IL-10.

As citocinas inflamatórias podem influenciar duas vias neurofarmacológicas importantes: monoaminérgicas e glutamatérgicas. A presença de citocinas pode ocasionar a diminuição de serotonina 5-HT disponível através da diminuição de triptofano para a síntese, aumento da liberação e metabolismo, além de influenciar a expressão de receptores 5-HT1A e 5-HT2 (BORTOLATO *et al.*, 2015; SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005). Em relação ao glutamato, a citocinas inflamatórias promovem liberação, diminuem a sua receptação ou atuam como agonista NMDA_R (SCHWARCZ *et al.*, 2012), predispondo à excitotoxicidade. Além

disso, as citocinas influenciam nas vias neurotróficas, podendo reduzir o número de sinapses e a expressão de BDNF (CAI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2013).

Bilici *et al* (2001), Nestler *et al* (2002) e Curmucu *et al* (2009) mostraram que o uso de citocinas antiinflamatórias tem se mostrado efetivo como adjuvante no tratamento da depressão com melhora significativa dos resultados em associação com os tratamentos tradicionais.

Levando em consideração os efeitos mais específicos de cada uma, já está demonstrado que níveis aumentados de IL-2 podem levar à apoptose, diminuir a diferenciação neuronal, suprimir a transmissão sináptica e inibir a indução e a manutenção da potenciação de longo prazo, que é expressada comportamentalmente em déficits de aprendizado e, por fim, em depressão (LOPRESTI *et al.*, 2014).

A IL-6 é necessária em nível hipotalâmico para a indução dos efeitos do estresse crônico relacionado ao cortisol, e merece destaque devido ao seu aumento em pacientes com manifestações melancólicas, incluindo anedonia, perda de peso e insônia (DUNJIC-KOSTIC *et al.*, 2013). Além disso, em pacientes com níveis aumentados de IL-6, os antidepressivos monoaminérgicos não reverteram tais sintomas (SUKOFF RIZZO *et al.*, 2012).

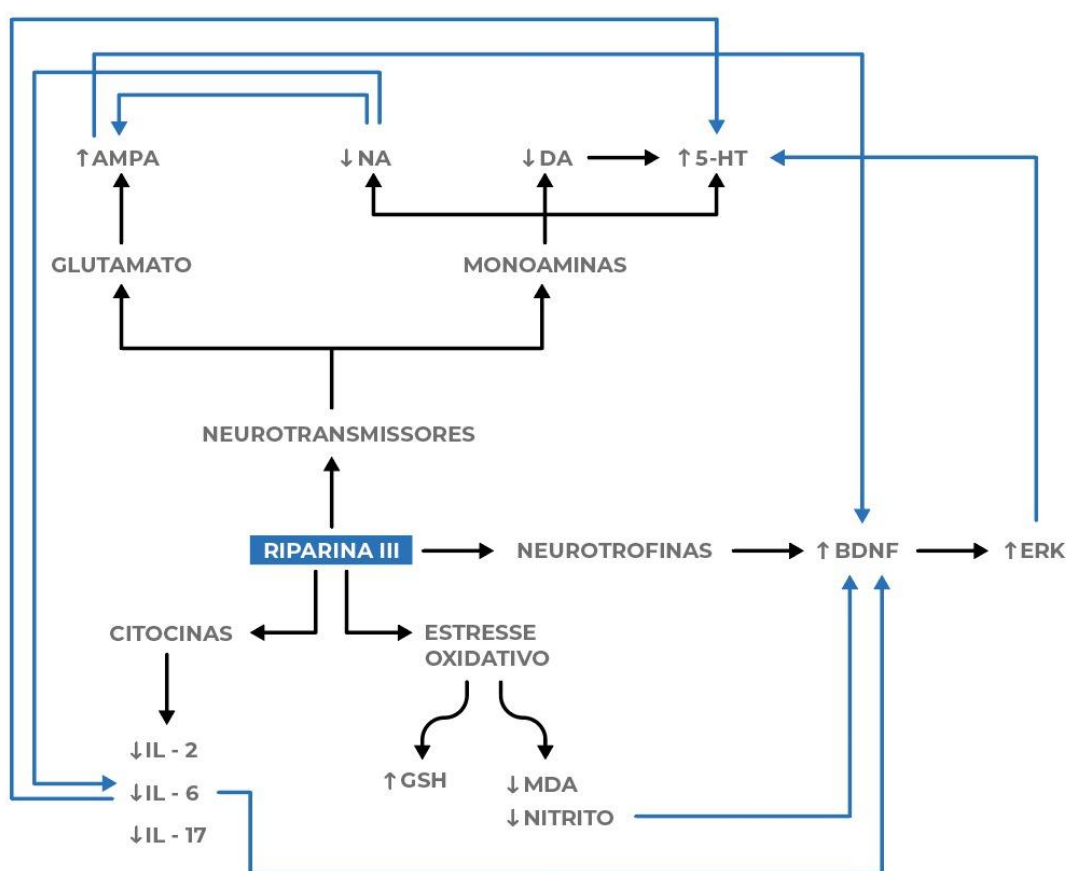
A ativação do eixo HHA estimula a liberação de noradrenalina na circulação sistêmica, que por conseguinte, estimula a produção de IL-6 e ambas estimulam a síntese de várias proteínas que desempenham efeitos pró-inflamatórios e pró-trombóticos importantes para a resposta ao estresse (BORTOLATO *et al.*, 2015; GOLD, 2015; SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005). Apesar dos glicocorticoides apresentarem vários efeitos anti-inflamatórios, altos níveis de cortisol geram alterações que resultam em estímulos pró-inflamatórios como aumento da gordura visceral, resistência a insulina ou hiperinsulinemia e estímulo simpático (IZAOLA *et al.*, 2015).

Em relação ao TNF, sua associação com níveis alterados de monoaminas tem sido descrita, com aumento da metabolização de 5-HT e redução dos níveis de NA, bem como inibição da liberação de NA. Além disso, uma combinação de alterações de NA e 5-HT e o aumento da toxicidade do glutamato pode consistir no elemento mais importante na tradução de alterações inflamatórias neuroquímicas em comportamento depressivo em humanos (CLEMENT *et al.*, 1997; FASICK *et al.*, 2015).

Nadeem et al (2017), mostrou em estudo que o aumento de IL-17 estava relacionado com sintomas de depressão. É provável que Th17 promova neuroinflamação através da ativação da micróglia e astrócitos, ações que podem contribuir para o dano neuronal (BEUREL, LOWELL, 2018).

Considerando os achados do presente estudo as várias maneiras como podem estar interligados, a figura 12 mostra uma proposta de possível mecanismo de ação da Rip III.

Figura 12 – Possível mecanismo de ação da Riparina III



Fonte: Autoria própria.

Apesar da variedade de antidepressivos disponíveis comercialmente, muitos apresentam taxas de resposta relativamente baixas, taxas significantes de recidiva da doença e efeitos adversos graves, o que dificulta a adesão à terapia pelo paciente (BILICI *et al.*, 2001; CUMURCU *et al.*, 2009; NESTLER *et al.*, 2002). Além disso, o tratamento atual melhora os sintomas como um todo e, alguns considerados muito importantes, como anedonia e perda de

memória podem persistir. Portanto, a busca por uma terapia não só eficaz, mas que possa ser mais efetiva é necessária. Além disso, considerando que ainda não é possível mensurar no paciente qual das vias envolvidas na depressão o acomete, torna-se importante o desenvolvimento de medicamentos com substâncias que ajam em múltiplas vias, assim como indicaram os achados relacionados à Riparina III.

6 CONCLUSÃO

Considerando que a terapia atual é insuficiente em alguns casos, o uso de outros agentes deve ser considerado. Rip III aparece, assim, como uma substância promissora no tratamento da depressão, dadas as suas propriedades restauradoras nos níveis de monoaminas e BDNF, além da redução dos danos do estresse oxidativo e da inflamação. Por isso, a continuidade dos estudos é interessante afim de aprofundar e ampliar o conhecimento de seus efeitos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo permitem inferir que Rip III demonstrou:

- ✓ Atividade antidepressiva através do teste do nado forçado;
- ✓ Atividade ansiolítica através do teste da placa perfurada;
- ✓ Preservação da memória de curto prazo no teste de esquiva passiva;
- ✓ Modulação os níveis de monoaminas noradrenalina, dopamina e serotonina;
- ✓ Modulação da expressão de ERK, confirmando mais um fator envolvido na expressão de BDNF e nos níveis de monoaminas;
- ✓ Influencia os níveis de glutamato através de maior ativação do receptor AMPA;
- ✓ Atividade neuroprotetora antioxidante através da redução de MDA e nitrito, seguida do aumento de GSH;
- ✓ Atividade anti-inflamatória através da redução de IL-2, IL-6, IL-17.

REFERÊNCIAS

AAN HET ROT, M.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **CMAJ : Canadian Medical Association Journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 180, n. 3, p. 305-13, 3 fev. 2009.

AGUILERA, G. HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 2-3, p. 90-95, 2011.

ANDREWS, P. W.; THOMSON, J. A. The bright side of being blue: Depression as an adaptation for analyzing complex problems. **Psychological Review**, v. 116, n. 3, p. 620-654, jul. 2009.

ASTHANA, M. K. *et al.* Preventing the Return of Fear Using Reconsolidation Update Mechanisms Depends on the Met-Allele of the Brain Derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 6, p. pyv137, 30 dez. 2016.

BARBOSA-FILHO *et al.* C. M. Benzoyl Esters and Amides. Styrylpyrones and Neolinans from the fruits of Aniba Riparia. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2615-2617, 1987.

BAUNE, B. T.; LI, X.; BEBLO, T. Short- and long-term relationships between neurocognitive performance and general function in bipolar disorder. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 35, n. 7, p. 759-774, 19 ago. 2013.

BAUNE, B. T.; RENGGER, L. Pharmacological and non-pharmacological interventions to improve cognitive dysfunction and functional ability in clinical depression – A systematic review. **Psychiatry Research**, v. 219, n. 1, p. 25-50, 30 set. 2014.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, nov. 1971.

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major Depressive Disorder. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 1, p. 55–68, 3 jan. 2008.

BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major Depression. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 5, p. 981–1005, set. 2014.

BEUREL, E.; LOWEL, J.A. TH17 cells in depression. Brain, behavior and immunity. v.69, p 28-34, 2018.

BILICI, M. *et al.* Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43-51, abr. 2001.

- BLIER, P.; EL MANSARI, M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1615, p. 20120536-20120536, 25 fev. 2013.
- BOISSIER, J. R.; SIMON, P. La reaction de exploration chez la souris. **Therapie**, v. 17, p. 1225-1232, 1962.
- BORTOLATO, B. *et al.* The Involvement of TNF- α in Cognitive Dysfunction Associated with Major Depressive Disorder: An Opportunity for Domain Specific Treatments. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 5, p. 558-76, 2015.
- BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n. 2, p. 63-7, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 7 maio 1976.
- BRASIL. **Brasil tem maior número de casos de depressão na América Latina | Agência Brasil**. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2017-02/depressao-brasil-tem-maior-prevalencia-de-casos-na-america-latina>>. Acesso em: 9 jun. 2019.
- BRASILEIRA, R.; VALLI, L. G. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, 2014. Disponível em: <<http://www.revneuropsiq.com.br>>. Acesso em: 9 jun. 2019.
- BRUNONI, A. R. *et al.* BDNF blood levels after electroconvulsive therapy in patients with mood disorders: A systematic review and meta-analysis. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 411-418, 16 jul. 2014.
- BRUNONI, A. R. *et al.* Assessment of non-BDNF neurotrophins and GDNF levels after depression treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation in a factorial, randomized, sham-controlled trial (SELECT-TDCS): an exploratory analysis. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 56, p. 91-96, 2 jan. 2015.
- BRUNONI, A. R.; LOPES, M.; FREGNI, F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 8, p. 1169-1180, dez. 2008.
- CAI, S.; HUANG, S.; HAO, W. New hypothesis and treatment targets of depression: an integrated view of key findings. **Neuroscience Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 61-74, 9 fev. 2015.
- SONG, C. *et al.* Enhanced inflammatory and T-helper-1 type responses but suppressed lymphocyte proliferation in patients with seasonal affective disorder and treated by light therapy. **Lam Journal of Affective Disorders**, v. 185, p. 91-96, 2015.
- CALDARONE, B. J.; ZACHARIOU, V.; KING, S. L. Rodent models of treatment-resistant depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 51-65, 2014.

CAPIBARIBE, V. C. C. **Potencial antidepressivo do timol: efeitos sobre os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no modelo de estresse crônico induzido por corticosterona em camundongos.** 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Echerichia Coli* multiresistentes. **RABC**, v. 34, n. 4, p. 247-249, 2005.

CHA, J. H. *et al.* Neurotoxicity induced by alkyl nitrites: Impairment in learning/memory and motor coordination. **Neuroscience Letters**, v. 619, p. 79-85, 2016.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. *In: Methods Enzymol.* [s.l: s.n.]. p. 764-775.

CHAVES, R. de C. **Efeito antidepressivo da Riparina IV sobre padrões comportamentais e neuroquímicos de camundongos expostos ao modelo de estresse crônico induzido pela administração de corticosterona.** 2019. 118 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

CLEMENT, H. W. *et al.* Effects of interferon, interleukin-1, and tumor necrosis factor on the serotonin metabolism in the nucleus raphe dorsalis of the rat. **Journal of Neural Transmission**, v. 104, n. 10, p. 981-991, out. 1997.

CUMURCU, B. E. *et al.* Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 63, n. 5, p. 639-645, out. 2009.

CUSTÓDIO, C. S. *et al.* Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders. **Molecular Neurobiology**, 23 maio 2017.

D'AMATO, F. R. D.; RIZZI, R.; MOLES, A. A model of social stress in dominant mice Effects on sociosexual behaviour. **Physiol Behav**, v. 73, n. 3, p. 421-426, 2001.

DALLÉ, E.; DANIELS, W. M. U.; MABANDLA, M. V. Fluvoxamine maleate normalizes striatal neuronal inflammatory cytokine activity in a Parkinsonian rat model associated with depression. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 189-196, jan. 2017.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463-475, 13 jun. 2005.

DE MELO, C. T. V. *et al.* Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451-4, mar. 2006.

DE QUERVAIN, D. J.-F. *et al.* Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 358-370, ago. 2009.

DEAR, J. W.; BATEMAN, D. N. Antidepressants. **Medicine**, v. 44, n. 3, p. 135-137, mar. 2016.

DEL PORTO, J. A. *et al.* Fluvoxamina no transtorno depressivo maior: um estudo multicêntrico aberto. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 56, n. 1, p. 17-22, 2007.

DILLON, D. G.; PIZZAGALLI, D. A. Mechanisms of Memory Disruption in Depression. **Trends in Neurosciences**, v. xx, 2017.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421-31, 1990.

DUBEY, V. K. *et al.* Possible involvement of corticosterone and serotonin in antidepressant and antianxiety effects of chromium picolinate in chronic unpredictable mild stress induced depression and anxiety in rats. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 29, p. 222-6, jan. 2015.

DUMBELL, R.; MATVEEVA, O.; OSTER, H. Circadian Clocks, Stress, and Immunity. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, p. 37, 2016.

DUNJIC-KOSTIC, B. *et al.* Melancholic and atypical major depression — Connection between cytokines, psychopathology and treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 43, p. 1-6, 3 jun. 2013.

DWIVEDI, Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 5, p. 433-49, 2009.

EDWARD, B.; SHANNON, M. The Serotonin Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1112-1120, 17 mar. 2005.

FASICK, V. *et al.* The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 53, p. 139-159, jun. 2015.

FORTUNATO, J. J. *et al.* Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1425-1430, 13 nov. 2009.

FOURNIER, J. C. *et al.* Antidepressant Drug Effects and Depression Severity. **JAMA**, v. 303, n. 1, p. 47, 6 jan. 2010.

FRANCISCO DE SOUSA, R. *et al.* Ansiedade: aspectos gerais e tratamento com enfoque nas plantas com potencial ansiolítico. **REVINTER**, v. 11, 2018.

FUCHS, E. Neurogenesis in the adult brain: is there an association with mental disorders? **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 257, n. 5, p. 247-249, 6 ago. 2007.

GARTLEHNER, G. *et al.* Comparative benefits and harms of second-generation antidepressants: background paper for the American College of Physicians. **Annals of internal medicine**, v. 149, n. 10, p. 734-50, 18 nov. 2008.

GHARBIA, S. A. P. **Common side effects of antidepressants**. Disponível em: <<https://www.pdr.net/>>. Acesso em: 9 jun. 2019.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, n. 1, p. 87–98, jul. 1986.

GOLD, P. W. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 32-47, 9 fev. 2015.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1 out. 1982.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Effect of a novel 5-HT₃ receptor antagonist 4i, in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. **Steroids**, v. 96, p. 95-102, abr. 2015.

HALLMAN, H.; JONSSON, G. Monoamine neurotransmitter metabolism in microencephalic rat brain after prenatal methylazoxymethanol treatment. **Brain Research Bulletin**, v. 13, n. 3, p. 383-389, set. 1984.

HAMMAD, T. A.; LAUGHREN, T.; RACOOSIN, J. Suicidality in Pediatric Patients Treated With Antidepressant Drugs. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 3, p. 332, 1 mar. 2006.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 54-63, 2013.

HAN, Q.-Q.; YU, J. Inflammation: a mechanism of depression? **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 3, p. 515-23, jun. 2014.

HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 9, n. 3, p. 155-61, out. 2010.

HASSAN, H. A.; HAFEZ, H. S.; ZEGHEBAR, F. E. Garlic oil as a modulating agent for oxidative stress and neurotoxicity induced by sodium nitrite in male albino rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, p. 1980-1985, jul. 2010.

HAWTON, K. *et al.* Toxicity of antidepressants: rates of suicide relative to prescribing and non-fatal overdose. **British Journal of Psychiatry**, v. 196, n. 5, p. 354-358, 2 maio 2010.

IJIMA, M. *et al.* Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats. **Brain Research**, v. 1359, p. 75-80, 2010.

INOUE, T.; KOYAMA, T. Effects of acute and chronic administration of high-dose corticosterone and dexamethasone on regional brain dopamine and serotonin metabolism in rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 147-56, jan. 1996.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v. 341, p. 79-90, 2 abr. 2017.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain research**, v. 978, n. 1-2, p. 177-84, 18 jul. 2003.

JOELS, M.; SARABDJITSINGH, R. A.; KARST, H. Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 901-938, 1 out. 2012.

JOSHI, H.; PARLE, M. Brahmi rasayana improves learning and memory in mice. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 3, n. 1, p. 79-85, mar. 2006.

KAPCZINSKI, F. *et al.* Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, n. 3, p. 243-245, set. 2008.

KELLER, M. C.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1521-1529, 2007.

KESSLER, R. C.; MERIKANGAS, K. R.; WANG, P. S. Prevalence, Comorbidity, and Service Utilization for Mood Disorders in the United States at the Beginning of the Twenty-first Century. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 3, n. 1, p. 137-158, abr. 2007.

KIM, K.-S.; HAN, P.-L. Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 3, p. 497-507, 15 fev. 2006.

KIM, Y.-K. *et al.* The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 277-284, 4 jan. 2016.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. 【BD-3A】 The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

LAWS, D.; ASHFORD, J. J.; ANSTEE, J. A. A multicentre double-blind comparative trial of fluvoxamine versus lorazepam in mixed anxiety and depression treated in general practice. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 81, n. 2, p. 185-9, fev. 1990.

LEE, B. *et al.* The CREB/CRE transcriptional pathway: protection against oxidative stress-mediated neuronal cell death. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, n. 5, p. 1251-1265, mar. 2009.

LOPES, I. S. *et al.* Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 33-42, nov. 2018.

- LOPRESTI, A. L. *et al.* A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 102-111, 3 jan. 2014.
- LOTTRICH, F. E. Inflammatory cytokine-associated depression. **Brain Research**, v. 1617, p. 113-125, 18 ago. 2015.
- LUCCA, G. *et al.* Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International**, v. 54, n. 5-6, p. 358-362, maio 2009.
- LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav.Pharmacol**, v. 8, n. 523-532, 1997.
- LUSSIER, A. L. *et al.* The progressive development of depression-like behavior in corticosterone-treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 174-183, ago. 2013.
- MAEHLY, A. C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. **Methods of biochemical analysis**, v. 1, p. 357-359, 1954.
- MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 664-675, 29 abr. 2011.
- MAO, Q. Q. *et al.* Peony glycosides reverse the effects of corticosterone on behavior and brain BDNF expression in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 1, p. 305-309, 2012.
- MARGIS, R. *et al.* Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, n. suppl 1, p. 65-74, abr. 2003.
- MARIN, M.-F.; RAYMOND, C.; LUPIEN, S. J. Memory and Stress. **Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology**, p. 69-78, 1 jan. 2019.
- MARKS, W.; FOURNIER, N. M.; KALYNCHUK, L. E. Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 1-2, p. 67-72, 4 ago. 2009.
- MCREYNOLDS, J. R. *et al.* Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 93, n. 3, p. 312-321, mar. 2010.
- MELCHERT, M. *et al.* External stress increases sympathoadrenal activity and prolongs the expulsive phase of foaling in pony mares. **Theriogenology**, v. 128, p. 110-115, 1 abr. 2019.
- MELEIRO, A. M. A. da S. Considerações sobre fatores neurobiológicos do comportamento suicida em pacientes com transtorno afetivo bipolar. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, v. 71, n. 1(esp.), 2014.

MELO, C. T. V. **Investigação do efeito antidepressivo da Riparina III**: alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo. Fortaleza, 2012.

MELO, C. T. V. *et al.* Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 104-112, 2013.

MELO, T. G. *et al.* Antidepressants differentially modify the extinction of an aversive memory task in female rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 37, n. 1, p. 33-40, 27 abr. 2012.

MENDONÇA NETTO, S. *et al.* Anxiolytic-like effect of *Rauvolfia ligustrina* Willd: ex Roem. & Schult., Apocynaceae, in the elevated plus-maze and hole-board tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 888-892, dez. 2009.

MOLENDIJK, M. L. *et al.* Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 791-800, 20 jul. 2014.

MONDIN, T. C. *et al.* Circadian preferences, oxidative stress and inflammatory cytokines in bipolar disorder: A community study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 301, p. 23-29, 2016.

MOURA, F. A. *et al.* Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**, v. 6, p. 617-639, dez. 2015.

NAIK, S. R.; THAKARE, V. N.; PATIL, S. R. Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: Evidence of its antioxidant property. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 5, p. 419-431, jul. 2011.

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

NIKKHESLAT, N.; PARIANTE, C. M. Z. Neuroendocrine Abnormalities in Major Depression: An Insight Into Glucocorticoids, Cytokines, and the Kynurenine Pathway. In: BAUNE, B. T. (Ed.). **Inflammation and Immunity in Depression**: Basic Science and Clinical Applications, 2018. p. 45-60.

NIMH. **NIMH » Questions and Answers about the NIMH Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) Study — All Medication Levels.** Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/funding/clinical-research/practical/stard/allmedicationlevels.shtml>>. Acesso em: 8 out. 2017.

OGREN, S. O.; STIEDL, O. Passive Avoidance. In: STOLERMAN, I. P. (Ed.), **Encyclopedia of psychopharmacology**, 2013. p. 960-967.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, jun. 1979.

OLIVEIRA, N. F. de. **Efeito antidepressivo e ansiolítico da riparina IV**: envolvimento monoaminérgico, GABAérgico e neuroinflamatório. 2019. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

OPAS/OMS. **OPAS/OMS Brasil - Com depressão no topo da lista de causas de problemas de saúde, OMS lança a campanha “Vamos conversar”**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5385:com-depressao-no-topo-da-lista-de-causas-de-problemas-de-saude-oms-lanca-a-campanha-vamos-conversar&Itemid=839>. Acesso em: 9 jun. 2019.

OPAS/OMS. **OPAS/OMS Brasil - Depressão**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095>. Acesso em: 9 jun. 2019.

OPAS/OMS BRASIL. **folha informativa - Depressão**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095>. Acesso em: 31 mar. 2019.

OTTEVANGER, E. A. The efficacy of fluvoxamine in patients with severe depression. **British Journal of Clinical Research**, v. 2, p. 125-132, 1991.

PAN, Y. *et al.* The effects of central pro-and anti-inflammatory immune challenges on depressive-like behavior induced by chronic forced swim stress in rats. **Behavioural brain research**, v. 247, p. 232-40, 15 jun. 2013.

PARKER, K. J.; SCHATZBERG, A. F.; LYONS, D. M. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. **Hormones and behavior**, v. 43, n. 1, p. 60-6, jan. 2003.

PASQUALI, M. A. *et al.* A longitudinal study of neurotrophic, oxidative, and inflammatory markers in first-onset depression in midlife women. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 268, n. 8, p. 771-781, 26 dez. 2018.

PERITO, M. E. S.; FORTUNATO, J. J. Marcadores biológicos da depressão: Uma revisão sobre a expressão de fatores neurotróficos. **Revista Neurociencias**, v. 20, p. 597-603, 2012.

PHAM, K. *et al.* Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 4, p. 879-886, 2003.

PITTA, S. *et al.* Honokiol reverses depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels induced by chronic corticosterone injections in mice. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 5, p. 211-215, 1 set. 2013.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 229, n. 2, p. 327-36, out. 1977.

QIAO, H. *et al.* Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 275, p. 191-200, 15 dez. 2014.

RIBEIRO, B. M. M. *et al.* Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: Reversal by clozapine. **Schizophrenia Research**, v. 151, n. 1-3, p. 12-19, dez. 2013.

RUSH, A. J. STAR*D: What Have We Learned? **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 2, p. 201-204, fev. 2007.

SAKELLARIOU, M. O.; STEFANATOU, A. Neurobiology of PTSD and implications for treatment: An overview. **Current Research: Integrative Medicine**, v. 02, n. 01, 26 mar. 2017.

SARANDOL, A. *et al.* Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidant-antioxidant systems. **Hum psychopharmacol**, v. 22, n.2, p. 67-73, 2007.

SCHIEPERS, O. J. G.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201-217, fev. 2005.

SEDLÁK, J.; L'HANUS, H. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. **Endocrinologia experimentalis**, v. 16, n. 2, p. 103-109, jun. 1982.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 24 out. 1968.

SERAFINI, M. R. *et al.* *Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1159-1166, out. 2011.

SHELINE, Y. I.; GADO, M. H.; KRAEMER, H. C. Untreated Depression and Hippocampal Volume Loss. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 8, p. 1516-1518, ago. 2003.

SILVA, M. C. C. *et al.* Augmentation therapy with alpha-lipoic acid and desvenlafaxine: A future target for treatment of depression? **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 8, p. 685-695, 16 ago. 2013.

SMAGA, I. *et al.* Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 3, p. 569-580, jun. 2015.

SONAWALLA, S. B. *et al.* Efficacy of fluvoxamine in the treatment of major depression with comorbid anxiety disorders. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 60, n. 9, p. 580-3, set. 1999.

SOUERY, D.; PAPAKOSTAS, G. I.; TRIVEDI, M. H. Treatment-resistant depression. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 67, Suppl 6, p. 16-22, 2006.

SOUSA, M. B. C. DE; SILVA, H. P. A.; GALVÃO-COELHO, N. L. Resposta ao estresse: I.

Homeostase e teoria da alostase. **Estudos de Psicologia**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2015.

SOUSA, F. C. *et al.* Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 1, p. 27-33, maio 2004.

STANWOOD, G. D. Dopamine and Stress. **Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology**, p. 105-114, 1 jan. 2019.

STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777-790, 30 jun. 2010.

STEWART, A. One Last Time. **Psychiatric News**, v. 54, n. 10, 17 maio 2019.

SUKOFF RIZZO, S. J. *et al.* Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 12, p. e199-e199, 4 dez. 2012.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

THAKARE, V. N.; DHAKANE, V. D.; PATEL, B. M. Potential antidepressant-like activity of silymarin in the acute restraint stress in mice: Modulation of corticosterone and oxidative stress response in cerebral cortex and hippocampus. **Pharmacol Rep**, v. 86, n. 5, p. 1020-7, jul. 2016.

ULAK, G. *et al.* P.1.d.003 Effects of zaprinast and rolipram on spatial memory in the radial arm maze test in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. S291-S292, 1 set. 2011.

VALLE, A.; OLIVER, J.; ROCA, P. Role of Uncoupling Proteins in Cancer. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 567-591, 16 abr. 2010.

VALLE, L. E. L. R. do. **Estresse e distúrbios do sono no desempenho de professores: saúde mental no trabalho**. 2011. Tese (Doutorado em Psicologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

VALLI, L. G.; SOBRINHO, J. de. A. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 18, n. 1, p. 58-67, jan./abr. 2014.

VAN DEN BUUSE, M.; HALE, M. W. Serotonin in Stress. **Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology**, p. 115-123, 1 jan. 2019.

VAN VELZEN, L. S. *et al.* Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 76, p. 140-144, 2 jun. 2017.

VARANDAS, P. O modelo da neuroplasticidade na depressão. **Saúde Mental**, 2006.

VARGAS, H. O. *et al.* Oxidative stress and inflammatory markers are associated with depression and nicotine dependence. **Neuroscience Letters**, v. 544, p. 136-140, 7 jun. 2013.

VASCONCELOS, A. S. **Efeito antidepressivo da riparina III em camundongos submetidos ao modelo de estresse induzido pela administração de corticosterona**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

VASCONCELOS, A. S. *et al.* Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 394-403, 1 ago. 2015.

VINCENT, M. Y. *et al.* Sensitivity of depression-like behavior to glucocorticoids and antidepressants is independent of forebrain glucocorticoid receptors. **Brain Research**, v. 1525, p. 1-15, 7 ago. 2013.

WANG, T. *et al.* Relations between trait anxiety and depression: A mediated moderation model. **Journal of Affective Disorders**, v. 244, p. 217-222, 1 fev. 2019.

WIGNER, P. *et al.* The molecular aspects of oxidative & nitrosative stress and the tryptophan catabolites pathway (TRYCATs) as potential causes of depression. **Psychiatry Research**, v. 262, p. 566-574, abr. 2018.

WILLNER, P. **Behavioural models in psychopharmacology** : theoretical, industrial, and clinical perspectives. [s.l.] Cambridge University Press, 1991.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.

WOLAK, M. *et al.* Involvement of NMDA and AMPA receptors in the antidepressant-like activity of antidepressant drugs in the forced swim test. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 991-997, 1 jul. 2013.

YANKELEVITCH-YAHAV, R. *et al.* The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments**, n. 97, 2 mar. 2015.

YOUNG, J. J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, p. 15-20, dez. 2014.

YU, S.; HOLDSBOER, F.; ALMEIDA, O. F. X. Neuronal actions of glucocorticoids: Focus on depression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, n. 3-5, p. 300-309, 1 fev. 2008.

ZALETTEL, I.; FILIPOVIĆ, D.; PUŠKAŠ, N. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. **Reviews in the Neurosciences**, v. 28, n. 6, p. 675-692, 26 jan. 2017.

ZHAO, Y. *et al.* A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, n. 1-2, p. 113-120, 2008.

ZUARDI, A. W. **Fisiologia do estresse e sua influência na saúde**. São Paulo, 2014.

Disponível em:

<https://www.academia.edu/8514738/FISIOLOGIA_DO_ESTRESSE_E_SUA_INFLUÊNCIA_NA_SAÚDE>. Acesso em: 9 jun. 2019

ZUNSZAIN, P. A. *et al.* Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 722-729, 29 abr. 2011.

APÊNDICE A – TRABALHOS PUBLICADOS COM A RIPARINA III

ARTIGO PUBLICADO

VASCONCELOS, A. S.; OLIVEIRA, I. C. M.; VIDAL, L. M. T.; RODRIGUES, G. C.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; GASPAR, D. M.; SOUSA, F. C. F. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology JCR**, 2015.

ARTIGO SUBMETIDO

VASCONCELOS MALLMANN, A.S.; OLIVEIRA, I.C.M.; CHAVES, R.C.; OLIVEIRA, N.F.; CAPIBARIBE, V.C.C.; VALENTIM, J.T.; SILVA, D.M.A.; RODRIGUES, G.C.; RIELLO, G.B.; CHAVES FILHO, A.; FONTELES, M.M.F.; VANCONCELOS, S.M.M.; MACEDO, D.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA FILHO, J.M.; CARVALHO, A.M.R.; SOUSA, F.C.F. Is Riparin III a promising drug in the treatment for depression?

RESUMO PUBLICADO EM PERIÓDICO DE QUALIS A2:

VASCONCELOS, S. M. M.; VASCONCELOS, A. S.; OLIVEIRA, I. C. M.; RODRIGUES, F. A. P.; CASTRO, L. A.; PONTES, M. C. D.; AGUIAR, J. A. C.; LIMA, A. E. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. P.1.g.113 Effects of riparins I and III on corticosterone-induced working and alerting memory impairment in mice. **European Neuropsychopharmacology JCR**, v. 24, p. S270, 2014.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

VASCONCELOS MALLMANN, A.S.; CHAVES, R. C. ; OLIVEIRA, N. F. ; CAPIBARIBE, V. C. C. ; CASTRO, L. C. O. ; RIELLO, G. B. ; GUTIERREZ, S. J. C. ; BARBOSA-FILHO, J. M. ; RODRIGUES, A. M. ; SOUSA, F. C. F. . Effect of Riparin III on inflammation induced by chronic stress in rodents. In: I Simpósio Luso-Brasileiro de Neurociências e II Simpósio Internacional em Neurociências, 2018, Fortaleza. I Simpósio Luso-Brasileiro de Neurociências e II Simpósio Internacional em Neurociências, 2018.

CASTRO, L. C. O. ; VASCONCELOS MALLMANN, A.S.; CHAVES, R. C. ; RIELLO, G. B. ; SOUSA, F. C. F. . Riparina III apresenta atividade antiinflamatória em modelo de estresse?. In: XXXVII Encontro de Iniciação Científica UFC, 2018, Fortaleza. XXXVII Encontro de Iniciação Científica UFC, 2018.

VASCONCELOS, A. S.; OLIVEIRA, I. C. M. ; OLIVEIRA, N. F. ; CHAVES, R. C. ; CAPIBARIBE, V. C. C. ; LIMA, F. A. V. ; RODRIGUES, G. C. ; BARBOSA-FILHO, JOSÉ M. ; ARAUJO, M. A. ; SILVA, D. M. A. ; LOPES, I. S. ; SOUSA, J. T. V. ; FERNANDES, M. L. ; SOUSA, F. C. F. . Anxiolytic effects of riparin III in mice exposed to chronic stress.

In: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2016, Foz do Iguaçu. Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2016.

ARAUJO, M. A. ; **VASCONCELOS, A. S.** ; SILVA, D. M. A. ; SOUSA, J. T. V. ; SOUSA, F. C. F. . Efeito da Riparina III nos níveis de monoaminas em camundongos expostos ao estresse crônico por corticosterona. In: Encontros Universitários, 2016, Fortaleza. Encontros Universitários 2016, 2016.

SILVA, D. M. A. ; **VASCONCELOS, A.S.** ; OLIVEIRA, I. C. M. ; CHAVES, R. C. ; OLIVEIRA, N. F. ; SOUSA, J. T. V. ; SOUSA, F. C. F. . Efeito da riparina III em camundongos submetidos a um modelo de depressão psicótica. In: Congresso Brasileiro da SBNp, 2015, Natal. Efeito da riparina III em camundongos submetidos a um modelo de depressão psicótica, 2015.

CHAVES, R. C. ; **VASCONCELOS, A. S.** ; OLIVEIRA, I. C. M. ; OLIVEIRA, N. F. ; LOPES, I. S. ; ALENCAR, R. N. ; SOUSA, F. C. F. . Efeito da riparina III na prevenção e reversão de sintomas de depressão em animais submetidos ao estresse crônico. In: XIV Congresso Brasileiro da SBNp, 2015, Natal. XIV Congresso Brasileiro da SBNp, 2015.

LOPES, I. S. ; RODRIGUES, G. C. ; **VASCONCELOS, A. S.** ; CHAVES, R. C. ; SOUSA, F. C. F. . Estudo do potencial antidepressivo da Riparina III: Efeitos comportamentais e neuroquímicos de camundongos expostos ao modelo de estresse crônico induzido pela administração de corticosterona.. In: XXXIV Encontro de Iniciação Científica da UFC, 2015, Fortaleza. XXXIV Encontro de Iniciação Científica da UFC, 2015.

VASCONCELOS, A. S.; OLIVEIRA, I. C. M.; RODRIGUES, G. C.; VIDAL, L. M. T.; CHAVES, R. C.; CASTRO, L. A.; LOPES, I. S.; PONTES, M. C. D.; SOUSA, F. C. F. **Riparina III effect of the reversal of anhedonia and abandonment in animals exposed to cronic stress.** In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2014, Fortaleza. Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2014.

VASCONCELOS, S. M. M.; **VASCONCELOS, A. S.**; OLIVEIRA, I. C. M.; RODRIGUES, F. A. P.; CASTRO, L. A.; PONTES, M. C. D.; AGUIAR, J.A.C.; LIMA, A. E. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. **Effects of riparins I and III on corticosterone-induced working and alerting memory impairment in mice.** In: 27th ECNP Congress, 2014, Berlin. European College of Neuropsychopharmacology, 2014.

RODRIGUES, G. C.; OLIVEIRA, I. C. M.; **VASCONCELOS, A. S.**; VIDAL, L. M. T.; SOUSA, F. C. F. **Administração repetida de riparina III induz efeito antidepressivo e eleva concentrações hipocampais de bdnf em camundongos.** In: XXXIII Encontro de Iniciação Científica da UFC, 2014, Fortaleza. XXXIII Encontro de Iniciação Científica, 2014.

PONTES, M. C. D.; SOUSA, P. B.; OLIVEIRA, I. C. M.; **VASCONCELOS, A. S.**; SOUSA, F. C. F. Riparinas I e III, isoladas da Aniba Riparia, normalizam a memória recente de camundongos expostos ao modelo de estresse crônico induzido por corticosterona. In: XXXII Encontro de Iniciação Científica - UFC, 2013, Fortaleza. Encontros Universitários 2013, 2013.

CASTRO, L. A.; PONTES, M. C. D.; **VASCONCELOS, A. S.**; OLIVEIRA, I. C. M.; SOUSA, F. C. F. **Efeito antidepressivo da Riparina III em animais expostos ao estresse**

crônico induzido pela administração de corticosterona. *In:* XXXII Encontro de Iniciação Científica - UFC, 2013, Fortaleza. Encontros Universitários 2013, 2013.

OLIVEIRA, I. C. M.; PONTES, M. C. D.; **VASCONCELOS, A. S.**; SOUSA, F. C. F. Effect of Riparin III e I, isolated from Aniba Riparia, on corticosterone-induced memory impairment in mice. *In:* I International Symposium in Neuroscience, 2013, Fortaleza. I International Symposium in Neuroscience, 2013.

OLIVEIRA, I. C. M.; PONTES, M. C. D.; **VASCONCELOS, A. S.**; CAPIBARIBE, V. C. C.; SOUSA, F. C. F. **Detection of antidepressant activity of Riparin through behavioral tests.** *In:* I International Symposium in Neuroscience, 2013, Fortaleza. I International Symposium in Neuroscience, 2013.

MENÇÕES HONROSAS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2017

Fiocruz - International Symposium on Neuroinflammation.

2016

Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica.

2014

I International Symposium in Neuroscience.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA III NO MODELO DO ESTRESSE CRÔNICO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA EM CAMUNDONGOS: POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS" protocolo nº06/2017, sob responsabilidade da Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião do dia 30 de janeiro de 2017.

Vigência do projeto	01/02/2017 a 01/12/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	329
Peso/Idade	4-8 semanas / 16-22g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 01 de fevereiro de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUAUFC - MATRÍCULA SIAPE 100932

Recebi



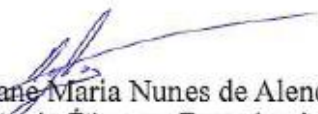
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 13/2014, sobre o projeto intitulado: **“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA III NO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO INDUZIDO POR CORTICOSTERONA EM CAMUNDONGOS”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 16 de maio de 2014.

Fortaleza, 16 de maio de 2014


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPAD/FF/FAMED/UFC
MAT. SIAPE 2168369

Recebi o original no dia 30/05/2014.

Adriana Rorconcelos