



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

**MANOELA DE OLIVEIRA REBOUÇAS**

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO, ANSIOLÍTICO E NEUROPROTETOR DO  $\alpha$ -  
BISABOLOL EM MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE INDUÇÃO POR  
LIPOPOLISSACARÍDEO**

**Fortaleza -CE**

**2024**

MANOELA DE OLIVEIRA REBOUÇAS

EFEITO ANTIDEPRESSIVO, ANSIOLÍTICO E NEUROPROTETOR DO  $\alpha$ -BISABOLOL  
EM MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE INDUÇÃO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa  
Florenço de Sousa  
Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

FORTALEZA -CE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

- R241e    Rebouças, Manoela de Oliveira Rebouças.  
          Efeito antidepressivo, ansiolítico e neuroprotetor do alfa-bisabolol em modelos in vivo e in vitro de indução por lipopolissacarídeo / Manoela de Oliveira Rebouças Rebouças. – 2024.  
          115 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2024.  
          Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.  
          Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.
1. Neuroinflamação. 2. Astrócitos. 3. PC12. 4. Depressão. I. Título.

CDD 660.6

---

MANOELA DE OLIVEIRA REBOUÇAS

EFEITO ANTIDEPRESSIVO, ANSIOLÍTICO E NEUROPROTETOR DO  $\alpha$ -BISABOLOL  
EM MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE INDUÇÃO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito para  
obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Gleidson Mendes Rebouças  
Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN)

---

Profª. Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra  
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

---

Profª. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

A Deus.

Aos meus pais, Didi e Norma.

## AGRADECIMENTOS

A Deus. Àquele que está, e sempre esteve, dentro de mim. Que me sustentou nos momentos mais difíceis desse percurso, que me trouxe segurança no meio do caos, guiou todos os passos, me auxiliou junto com os intercessores e que me presentou com os anjos aqui na terra.

Aos meus pais, Norma e Didi, que sempre viram os estudos como o único caminho. Obrigada por me proporcionarem todas as ferramentas para eu seguir as minhas escolhas. Obrigada por sempre fazerem o possível e o impossível, por me ensinar que não preciso ser melhor que os outros, mas que eu devo ser a melhor que eu consigo ser. Por serem meu ponto de partida e sempre meu caminho de volta. Obrigada por sempre incentivar, apoiar, acreditar e principalmente, a confiar nas minhas decisões profissionais. Eu escolheria vocês em todas as vidas que eu tivesse.

À minha irmã, Rafaela. Que, como irmã mais velha, sempre me ensinou tudo o que sabia, caminhou ao meu lado, e está comigo em todos os momentos. Obrigada por me apoiar em tudo, me escutar, pelo amor, por ter paciência nos momentos mais difíceis nessa trajetória e por me dá o melhor presente: Luís Miguel. Vocês são parte de mim.

Ao meu primo Gleidson, que foi minha primeira inspiração para o mundo acadêmico, que mesmo distante fisicamente, está sempre torcendo pelo meu sucesso. Obrigada por confiar que eu chegaria até aqui e pelo esforço para estar aqui engrandecendo meu trabalho.

Ao restante da minha família, que não é tão grande, mas que nunca mediram esforços para que eu chegasse aonde eu cheguei. Obrigada aos meus padrinhos, tios, tias e primo(a)s. Vocês sempre depositaram em mim um olhar bondoso, confiante e apoiador. Obrigada.

À minha irmã de alma, Evelline. Obrigada por ter sido a porta de entrada para conhecer o que é a amizade na mais completude da palavra. Obrigada pelo companheirismo de sempre, pelas conversas, pela escuta nos meus longos processos de terapia caseira, pelo apoio incondicional, pela confiança, pelo compartilhamento da Amy e da sua família, e por tudo o que a vida já nos presentou. Minha vida é muito mais feliz com você.

À minha amiga de vida: Mirella. Obrigada por compartilhar sua história comigo e me incentivar em todas as minhas escolhas. Obrigada pela sua amizade e respeito, pela sua sensibilidade diante dos momentos que eu mais precisei e por me inspirar a conquistar todos os meus objetivos de vida.

À Claudinha, que teve um papel essencial nessa trajetória. Obrigada por me ajudar a me encontrar na escrita, por ter sido minha co-co-co orientadora, pelas contribuições pertinentes

para este trabalho, obrigada por ser apoio nos momentos mais difíceis, escuta ativa, por compartilhar seu olhar sobre a vida e por estar comigo sempre.

Ao meu amigo Daniel, que segurou na minha mão desde o início dessa trajetória, pela confiança pessoal e profissional, por compartilhar seus anseios e dificuldades e por ser apoio quando eu preciso. Obrigada por mesmo diante das adversidades permanecer comigo até aqui.

À Larice, que caminhou comigo e compartilhou os detalhes da vida acadêmica. Obrigada pela sua disponibilidade, parceria e generosidade em ajudar nos experimentos quando mais precisei.

À minha amiga Erlânia, que foi meu ponto de partida para trabalhar com cultura de células. Que me ensinou, teve paciência em direcionar todos os passos, que foi escuta nos momentos que eu pensava que não daria certo e que chorou e sorriu comigo em todos os experimentos. Você é um presente na minha vida. Obrigada por dividir comigo parte da sua história.

À minha psicóloga Stéffany e psiquiatra Rizzia, que foram facilitadoras no processo de escrita. Obrigada por me ajudarem no processo tão difícil do autoconhecimento, pela gentileza e sensibilidade. Obrigada pela reestruturação e a busca pelo equilíbrio para atravessar essa etapa.

Aos amigos que fiz na Neuro: Sheila, que chegou brevemente e me trouxe uma leveza peculiar. Obrigada pela sua serenidade, escuta, olhar compreensivo, pelos risos e por todo compartilhamento. Aos alunos de iniciação científica: Guenda, Letícia, Paola e Amanda. Obrigada pelo comprometimento de vocês em aprender e disponibilizar-se para ajudar. À Iardja, Victor, Andressa e Ingridy, obrigada por estarem comigo nessa etapa.

Aos amigos que eu fiz no Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica – LBFBC: Ao Emanuel, um presente de Deus. Obrigada por prontamente disponibilizar do seu tempo para me ensinar, pela paciência com meu humor matinal excessivamente feliz. Obrigada pela troca, pela sua amizade, por esse olhar bondoso e pelo seu abraço constante. À Bell, que foi uma pessoa crucial para o andamento da cultura celular, que tornou minha amiga e a quem sou muito grata por estar comigo nessa. Obrigada por sua gentileza, generosidade e paciência. Obrigada por aceitar o desafio e confiar no nosso trabalho. A todos do LBFBC que deixaram os meus dias mais leves com os cafés e conversas sobre todos os assuntos da vida: Mac, Mateus, Bruna's e Marcelo. Obrigada por deixarem eu participar da vida de vocês.

À professora Alice a quem eu agradeço imensamente pelo acolhimento e confiança, pela gentileza, e por ter aceitado a compor a banca de defesa. Obrigada.

Ao Bruno, que aceitou a parceria na realização do *docking molecular*. Obrigada por prontamente disponibilizar muitas tardes de quinta-feira para reuniões e discussões que muito acrescentou no meu amadurecimento científico. Obrigada por tanta gentileza e disponibilidade.

A todos que ajudaram diretamente na execução dos experimentos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, assim como os funcionários do Biotério: Wesley, Augusto, Gabi, sr. Moreira, sr. Aduino, e Haroldo. Obrigada por terem sido facilitadores nesse processo tão desafiador que é trabalhar com animais. Às secretárias do Departamento de Farmácia: Dani e Fabi. Obrigada por sempre me receberem com sorriso. Vocês deixaram meus dias muito mais felizes com tanta positividade e gentileza.

Ao professor Ramon pela contribuição e ajuda na melhora do meu trabalho. Obrigada por estar sempre disponível e de escuta ativa. Obrigada por todo compartilhamento de vida pessoal e profissional.

À professora Renata, por ter aceitado participar da banca da defesa, e por ser uma inspiração profissional. Obrigada pela gentileza de sempre.

À Maria Júlia, obrigada por ter aceitado estar presente na banca da defesa. Obrigada pela confiança, acolhimento e pelo incentivo em aceitar novos desafios.

Às minhas amigas Ingrid, Jovilma e Valeska por serem pessoas que estão sempre acreditando no meu potencial e por distribuírem gentilezas quando eu mais preciso.

Aos amigos que fiz na Fiocruz, em especial à Bárbara, Natália, Manu, Karol's, Clarissa, Cássia, Eric, Júlio, Yhas e Gui. Obrigada por me aguentarem falar da tese praticamente todos os dias durante 2 anos e 9 meses. A troca diária com vocês me permitiu acreditar no meu potencial. Conviver com pessoas tão diferentes me ajudou a convergir muitas escolhas pessoais e profissionais, principalmente durante um momento tão difícil que foi a pandemia. Obrigada por estarem na minha vida.

Ao meu coorientador Tiago Sampaio, que foi um presente e uma grata surpresa nesses quatro anos de doutorado. Obrigada por ter acolhido todas as minhas ideias e ter ajudado a organizá-las. Obrigada por ter sido tão gentil e paciente com o meu lado ansioso e desesperado. Obrigada por sempre dizer que ia dar certo, mesmo quando tudo estava caótico. Obrigada pela disponibilidade, pelo acolhimento e cuidado que sempre teve comigo. Obrigada pela amizade e trocas tão positivas que deixa minha vida mais leve.

À minha orientadora Cléa Florenço, quão grata sou pela sua vida. Obrigada por ter me acolhido 6 anos atrás, por ter depositado tanta confiança, pelo compartilhamento de sentimentos e experiências de vida. Obrigada por acolher todas as minhas necessidades, por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma acreditei. Obrigada pelo incentivo, pelo *feedback*



positivo, pelas palavras de encorajamento que recebo constantemente, pela atenção, pelo lado humano que me inspira e que torna a profissão peculiar que eu tenho o prazer em dividir muitos momentos. Obrigada por tudo!

Aos camundongos, pois sem eles esse trabalho não seria realizado.

À Universidade Federal do Ceará, ao PPGF e à CAPES, por facilitarem essa jornada tão árdua.

Grata pela vida e pelas experiências que me foram concedidas.

“Eu quero desaprender para aprender de novo.  
Raspar as tintas com que me pintaram.  
Desencaixotar emoções, recuperar sentidos.”  
(Rubem Alves).

## RESUMO

A depressão é uma doença incapacitante que possui grande relevância para a saúde pública, despertando o interesse na busca de tratamento eficaz. Nesse contexto, compostos como terpenoides, são fortes candidatos para tal propósito, como por exemplo, o  $\alpha$ -bisabolol (BIS), álcool sesquiterpênico, que possui muitas atividades biológicas, inclusive, como anti-inflamatório. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial neuroprotetor do BIS em um modelo *in vivo* e *in vitro* de inflamação após a exposição ao lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Para isso, camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram submetidos a um modelo de administração sistêmica de LPS (0,5mg/kg) durante 10 dias, e tratados a partir do 5º dia com BIS (50mg/kg), salina (0,9%), escitalopram (10mg/kg) ou dexametasona (2mg/kg). Os animais realizaram testes comportamentais e foram mensurados níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal. No modelo *in vitro*, verificou-se o efeito do BIS sobre a viabilidade celular em linhagens de PC12 e astrócitos através do teste do MTT e por marcação de iodeto de propídeo. Foram mensuradas as ERO, o potencial transmembrânico mitocondrial, citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e INF $\gamma$  e o padrão de morte celular das duas linhagens expostas ao LPS e tratadas com o BIS. Por fim, as células foram avaliadas quanto à morfologia celular através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Buscou-se alvos moleculares através do *docking molecular* para verificar a afinidade de ligação do BIS com os alvos: TLR4, HMOX e PI3K. Os resultados mostraram que o BIS não apresentou efeito psicoestimulante e/ou relaxante, evidenciado no teste do campo aberto, e ainda reduziu a frequência de comportamento estereotipado (*rearing*) indicativo de ansiedade-like. Além disso, o tratamento com o BIS reverteu o comportamento depressivo símile nos animais, evidenciado pelo teste do nado forçado e *Splash*, além melhorar o sintoma de anedonia no teste de preferência pela solução de sacarose. Além disso, nos testes para avaliar o perfil ansiolítico do BIS, verificou a reversão do comportamento provocado pelo LPS e ainda, a melhora do prejuízo na memória de curto prazo. O BIS proporcionou redução nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e nitrito, e alterou os níveis das citocinas. Quanto ao modelo *in vitro*, na viabilidade celular, houve melhora no tratamento com o BIS assim como houve redução da ocorrência de eventos apoptóticos e necróticos em ambas as linhagens celulares. A produção de ERO foi reduzida com o BIS, e houve manutenção do potencial transmembrânico mitocondrial. Além disso, os níveis de citocinas pró-inflamatórias foram revertidos a níveis comparáveis aos do controle, demonstrando potencial efeito neuroprotetor do  $\alpha$ -bisabolol no

modelo de exposição ao LPS. O *docking molecular* evidenciou a estabilidade de ligação do BIS com os alvos TLR4, HMOX e PI3K, sendo o HMOX o alvo com maior afinidade sugerindo a exploração de novos alvos terapêuticos. Diante da redução de danos observada, o  $\alpha$ -bisabolol mostrou-se favorável para doenças de cunho neuroinflamatório, como a depressão.

**Palavras-chave:** neuroinflamação; astrócitos; PC12; depressão

## ABSTRACT

Seeking treatment for neuropsychiatric disorders, such as depression, is of great relevance to public health, given their disabling nature. In a scenario where the increasing involvement of neuroinflammation and diseases that affect the Central Nervous System (CNS) is perceived, interest is aroused in evaluating research with anti-inflammatory potential as a therapeutic alternative with a specifically neuroprotective effect. In this context, compounds such as terpenoids are strong candidates for this purpose, such as  $\alpha$ -bisabolol (BIS), a sesquiterpene alcohol with many biological activities, including anti-inflammatory properties. Therefore, the objective of the present work was to verify the neuroprotective potential of BIS in an in vivo and in vitro inflammation model after exposure to lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*. For this, male mice of the C57BL/6 lineage were subjected to a model of systemic administration of LPS (0.5mg/kg) for ten days and treated from the 5th day onwards with BIS (50mg/kg), saline (0.9%), escitalopram (10mg/kg) or dexamethasone (2mg/kg). On the last day, the animals performed behavioral tests to evaluate the depressive and anxiety-like profile, in addition to performing a short-term memory test. In addition, levels of reactive oxygen species (ROS), nitrogen, and pro-inflammatory cytokines were measured in the hippocampus and prefrontal cortex. In the in vitro model, the effect of BIS on cellular options in PC12 lines and astrocytes is provided through the MTT test and propidium iodide labeling. ROS, mitochondrial transmembrane potential, pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and INF $\gamma$ , and the pattern of cell death of the two lines exposed to LPS and treated with BIS were measured. Finally, the cells were evaluated for morphology using the Scanning Electron Microscope (SEM). To search for molecular targets, molecular docking was performed to verify the BIS binding layer with TLR4, HMOX, and PI3K targets. The results demonstrated that BIS did not present a psychostimulant and relaxing effect, evidenced in the open field test, and also prevented the frequency of stereotypical behavior (creation) indicative of anxiety-like. Furthermore, treatment with BIS reversed similar depressive behavior in animals, evidenced by the forced swim test and Splash, in addition to improving the symptom of anhedonia in the sucrose solution preference test. Furthermore, we tested ourselves to evaluate the anxiolytic profile of BIS, reversing the behavior caused by LPS and improving short-term memory impairment. BIS provided reduced substances reactive to thiobarbituric acid and nitrite and altered cytokine levels. As for the in vitro model, in cellular predictions, there was an improvement in treatment with BIS and a reduction in the occurrence of apoptotic and necrotic

events in both cell lines. ROS production was reduced about BIS, and mitochondrial transmembrane potential was maintained. Furthermore, the levels of pro-inflammatory cytokines were reverted to levels comparable to the control, demonstrating a potential neuroprotective effect of  $\alpha$ -bisabolol in the LPS exposure model. Molecular docking demonstrated the binding stability of BIS with the targets TLR4, HMOX, and PI3K, with HMOX being the target with the most incredible depth and focusing on exploring new therapeutic targets. Given the reduced damage observed,  $\alpha$ -bisabolol proved favorable for neuroinflammatory diseases like depression.

**Keywords:** neuroinflammation; astrocytes; PC12; depression

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Demonstração das hipóteses da etiologia da depressão.....	25
Figura 2 – Conexão entre Sistema Nervoso Central, sistema periférico e a produção de citocinas inflamatórias.....	28
Figura 3 – Linha experimental do modelo <i>in vivo</i> durante 10 dias de administração de LPS e 5 dias de tratamento com as substâncias testes. LPS: Lipopolissacarídeo.....	38
Figura 4 – Teste do Campo aberto.....	39
Figura 5 – Teste do Nado forçado.....	40
Figura 6 – Teste do respingo de sacarose ou <i>Splash</i> .....	41
Figura 7 – Teste de preferência pela solução de sacarose.....	42
Figura 8 – Teste do labirinto em cruz elevada ou <i>plus maze</i> .....	43
Figura 9 – Teste da placa perfurada.....	44
Figura 10 – Teste do labirinto em Y.....	45
Figura 11 – Descrição em quatro etapas para a realização do teste de redução do MTT para avaliação da citotoxicidade do (-)- $\alpha$ -bisabolol.....	49
Figura 12 – Linha experimental do modelo <i>in vitro</i> .....	50
Figura 13 – Representação do teste para avaliação de morte celular por apoptose precoce, tardia ou necrose.....	51
Figura 14 – Representação do teste para análise do potencial transmembrânico mitocondrial utilizando o corante de Rodamina123.....	53
Figura 15 – Princípio do teste para análise de Espécies Reativas de Oxigênio intracitoplasmáticas utilizando a conversão de DCFH-DA em DCFH e DCFoxi.....	54
Figura 16 – Parâmetros avaliados no teste do campo aberto. Número de cruzamentos ou <i>crossings</i> (A), número de levantamentos verticais ou <i>rearing</i> (B), Tempo (C) e número de entradas (D) na zona central, Tempo (E) e número de entradas (F) na zona periférica.....	59
Figura 17 – Trajeto do animal durante o teste (A) e mapa de calor (B) nos tempos de 5, 10 e 15 segundos.....	60
Figura 18 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	61
Figura 19 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol no teste da preferência pela solução de sacarose em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	62
Figura 20 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol no teste de <i>Splash</i> em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	63

Figura 21 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol sobre o percentual do número de entradas (A) e do tempo de permanência (B) nos braços abertos, no teste do labirinto em cruz elevada, em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	65
Figura 22 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol sobre o número de “mergulhos” ( <i>head dips</i> ), no teste da placa perfurada em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	66
Figura 23 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol sobre o número de alternâncias corretas, em percentual (%), no teste do labirinto em Y ( <i>plus maze</i> ), em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	67
Figura 24 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol nos parâmetros de estresse oxidativo através da mensuração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)(A e B), nitrito (C e D) e glutathiona reduzida (GSH)(E e F), em hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente, de animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	69
Figura 25 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol nos níveis de citocinas Interleucina 1 $\beta$ (IL1 $\beta$ )(A e B), Interleucina-6 (IL-6)(C e D) e Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )(E e F) em hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente, de animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.....	71
Figura 26 – Avaliação da toxicidade do $\alpha$ -bisabolol em células PC12 e Astrócitos. Avaliação de diferentes concentrações de $\alpha$ -bisabolol em PC12 após 12 horas de incubação (A) e após 24 horas de incubação (B). Avaliação de diferentes concentrações de $\alpha$ -bisabolol em Astrócitos, após a incubação de 12 horas (C) e após 24h (D).....	73
Figura 27 – Avaliação da viabilidade celular submetida ao tratamento com LPS e de LPS seguida de $\alpha$ -bisabolol em células PC12 (A) e Astrócitos (B).....	74
Figura 28 – Índices de morte celular causada pelo LPS e revertido pelo $\alpha$ -bisabolol em PC12(A) e Astrócitos (B) nas concentrações de 250 $\mu$ M e 500 $\mu$ M respectivamente, através da marcação de Iodeto de propídeo e Anexina V FITC.....	77
Figura 29 – Gráficos density plot representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por iodeto de propídeo (PI), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V em células PC12 e Astrócitos.....	78
Figura 30 – Mensuração das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em células PC12 (A) e astrócitos (B) após a indução por LPS e o tratamento com $\alpha$ -bisabolol.....	80
Figura 31 – Histograma representativo do ensaio de DCFH-DA demonstrando a produção de espécies reativas de oxigênio em células PC12 (A) e astrócitos (B).....	81



Figura 32 – Efeito do $\alpha$ -bisabolol no potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de PC12 (A) e Astrócitos (B), nas concentrações de 250 $\mu$ M e 500 $\mu$ M respectivamente.....	83
Figura 33 – Histograma representativo do ensaio de Rodamina123 demonstrando o potencial transmembrânico mitocondrial em células PC12 (A) e astrócitos (B).....	84
Figura 34 – Avaliação da modulação inflamatória induzida pelo LPS e tratado com $\alpha$ -bisabolol na mensuração de Interferon $\gamma$ (IFN $\gamma$ ), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 1 $\beta$ (IL1 $\beta$ ). Quantificação de IFN $\gamma$ em PC12 (A) e Astrócitos (B), de IL-6 em PC12 (C) e Astrócitos (D), e de IL1 $\beta$ em PC12 (E) e Astrócitos (F), com o tratamento de $\alpha$ -bisabolol na concentração de 250 $\mu$ M (PC12) e 500 $\mu$ M (Astrócitos) respectivamente.....	86
Figura 35 – Representação da morfologia das células PC12 sem tratamento (A), tratadas com LPS(50 $\mu$ g/ml) (B) e com LPS (50 $\mu$ g/ml) + BIS (250 $\mu$ M) (C) e Astrócitos sem tratamento (D), com LPS (50 $\mu$ g/ml) (E) e com LPS(50 $\mu$ g/ml) + BIS (500 $\mu$ M) através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	88
Figura 36 – <i>Docking molecular</i> evidenciando a ligação entre porção TLR4 e do $\alpha$ -bisabolol.....	92
Figura 37 – <i>Docking molecular</i> evidenciando a ligação entre porção do HMOX e do $\alpha$ -bisabolol.....	94
Figura 38 – <i>Docking molecular</i> evidenciando a ligação entre porção PI3K e do (-)- $\alpha$ -bisabolol.....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros gerados a partir da ancoragem molecular do $\alpha$ -bisabolol com as proteínas de ligação TLR4, HMOX e PI3K, e a energia de ligação da molécula controle de cada receptor.....	90
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANX	Anexina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BIS	$\alpha$ -bisabolol
CT	Controle
DCFH-DA	2',7' diacetato de diclorofluoresceína
DEX	Dexametasona
DMEM	Dulbecco modified eagles minimal essential médium
DMSO	Dimetilfulfóxido
DNTB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid).
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay.
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESC	Escitalopram
FDA	Food and Drug Administration
GLU	Glicina
HHA	Eixo Hipotalâmico Hipofisário Adrenal
HMOX/HO-1	Hemeoxigenase
IFN $\gamma$	Interferon-gama
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
ILE	Interleucina
LBP	Proteína de ligação ao LPS
LCE	Labirinto em cruz elevada
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio,
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEBF	Número de entradas nos braços fechados
NF-kB	Fator nuclear kappa B
PBS	Phosphate Buffer Solution.
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PP	Placa perfurada
PTBA	Percentual de tempo nos braços abertos

PTBF	Percentual de tempo nos braços fechados
RHO123	Rodamina 123
SAL	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TLR4	Receptor do tipo toll-like 4
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Teste do nado forçado
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	Tempo de permanência nos braços fechados
TRP	Triptofano
$\Delta\Psi_m$	Potencial transmembrânico mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1</b>	<b>Depressão.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2</b>	<b>Neuroinflamação e depressão.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3</b>	<b>Lipopolissacarídeo.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4</b>	<b>Potencial neuroprotetor do <math>\alpha</math>-bisabolol.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5</b>	<b>Efeito anti-inflamatório do <math>\alpha</math>-bisabolol e seus possíveis alvos moleculares.....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b><math>\alpha</math>-bisabolol.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Lipopolissacarídeo.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Escitalopram e Dexametasona.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Testes <i>in vivo</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.1</b>	<b><i>Animais</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.2</b>	<b><i>Delineamento experimental</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.3</b>	<b><i>Testes comportamentais</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.3.1</b>	<b><i>Teste do campo aberto</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.3.2</b>	<b><i>Teste do Nado Forçado</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.3.3</b>	<b><i>Teste do respingo ou Splash</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4.3.4</b>	<b><i>Teste da preferência pela solução de sacarose</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.3.5</b>	<b><i>Teste do labirinto em cruz elevada</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4.3.6</b>	<b><i>Teste da placa perfurada</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.3.7</b>	<b><i>Teste do labirinto em Y</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.4</b>	<b><i>Testes neuroquímico</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.4.1</b>	<b><i>Determinação de parâmetros de estresse oxidativo</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.4.2</b>	<b><i>Dosagem de citocinas</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b>Testes <i>in vitro</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.1</b>	<b><i>Manutenção e cultivo celular</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.2</b>	<b><i>Ensaio de citotoxicidade</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.3</b>	<b><i>Delineamento experimental</i>.....</b>	<b>49</b>

4.5.4	<i>Avaliação da integridade de membrana e exposição da fosfatidilserina</i> .....	50
4.5.5	<i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</i> .....	52
4.5.6	<i>Análise da produção de Espécies reativas de Oxigênio (ERO) citoplasmática</i> .....	53
4.5.7	<i>Avaliação dos níveis de IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IFN-<math>\gamma</math> no sobrenadante das células</i> .....	55
4.5.8	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	55
4.6	<i>Teste in silico</i> .....	56
4.6.1	<i>Docking molecular</i> .....	56
4.6.1.1	<i>Procedimento experimental</i> .....	56
4.7	<i>Análise estatística</i> .....	57
5	<b>RESULTADOS</b> .....	58
5.1	<i>Testes in vivo</i> .....	58
5.1.1	<i>Testes comportamentais</i> .....	58
5.1.1.1	<i>Teste do campo aberto</i> .....	58
5.1.1.2	<i>Teste do Nado Forçado</i> .....	59
5.1.1.3	<i>Teste da preferência pela solução da sacarose</i> .....	62
5.1.1.4	<i>Teste do respingo ou Splash</i> .....	63
5.1.1.5	<i>Teste do labirinto em cruz elevada</i> .....	64
5.1.1.6	<i>Teste da placa perfurada</i> .....	66
5.1.1.7	<i>Teste do labirinto em Y</i> .....	67
5.1.2	<i>Testes neuroquímicos</i> .....	68
5.1.2.1	<i>Determinação dos parâmetros oxidativos</i> .....	68
5.1.2.2	<i>Mensuração de citocinas</i> .....	70
5.2	<i>Testes in vitro</i> .....	72
5.2.1	<i>Ensaio de viabilidade celular</i> .....	72
5.2.2	<i>Avaliação do mecanismo de morte celular</i> .....	75
5.2.3	<i>Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)</i> .....	79
5.2.4	<i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</i> .....	82
5.2.5	<i>Avaliação de citocinas pró-inflamatórias</i> .....	85
5.2.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	87
5.3	<i>Docking molecular</i> .....	89
5.3.1	<i>TLR4</i> .....	91
5.3.2	<i>HMOX</i> .....	93

5.3.3	<i>PI3K</i> .....	95
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	97
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	105
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	106
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)</b> .....	115

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Depressão

O transtorno depressivo, tradicionalmente conhecido como depressão, é uma doença mental comum, que afeta aproximadamente 280 milhões de pessoas no mundo, e é classificada como leve, moderada ou grave, que acomete todas as faixas etárias e classes sociais. Trata-se de uma doença incapacitante, marcada por sintomas de tristeza recorrente, perda de interesse e prazer por atividades particulares e interpessoais, desesperança a respeito do futuro, alteração do sono e do apetite, e em casos de depressão grave, apresenta pensamento recorrente, e até mesmo o ato do suicídio (OMS, 2023).

Muitas causas estão relacionadas com a incidência da depressão, incluindo fatores sociais, como perdas de pessoas ou do trabalho, fatores biológicos como alteração hormonal em uma gestação, fatores psicológicos como abusos, exaustão, estresse pós-traumático, fatores genéticos pouco explorados, dentre outros (ALACEVICH et al., 2023).

Em meio ao cenário pós-pandêmico da COVID-19, há notória incidência e prevalência de depressão e distúrbios associados, como a ansiedade e prejuízos cognitivos relacionados à memória. Tais fatores estiveram envolvidos com o medo do futuro, devido à alta mortalidade causada pelo vírus, o estresse psicológico proporcionado pelo isolamento social, assim como a perda econômica e a rotina diária interrompida (LAKHAN; AGRAWAL; SHARMA, 2020).

Por ser um transtorno considerado heterogêneo, visto que a sintomatologia é distinta entre os pacientes, a depressão possui alguns agentes norteadores para o tratamento. Dentro do complexo contexto biológico, infere-se a causalidade de fatores envolvendo a neuroplasticidade, fatores endócrinos, metabólicos e inflamatórios.

A teoria monoaminérgica, que sugere a redução de neurotransmissores como a serotonina, noradrenalina e dopamina, está inserida como a mais conhecida das causas para a doença, visto que os antidepressivos atualmente presente no mercado atuam sobre o mecanismo dessas monoaminas (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019).

Ao tratar-se do cenário neuroendócrino, já é sabido que o estresse é uma resposta natural e inerente ao corpo humano, entretanto, quando ocorre cronicamente, afeta a homeostase interferindo na ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), induzindo a produção exacerbada do conhecido “hormônio do estresse”, o cortisol (corticosterona em roedores). A ativação excessiva desta, causa dessensibilização em seus receptores e,



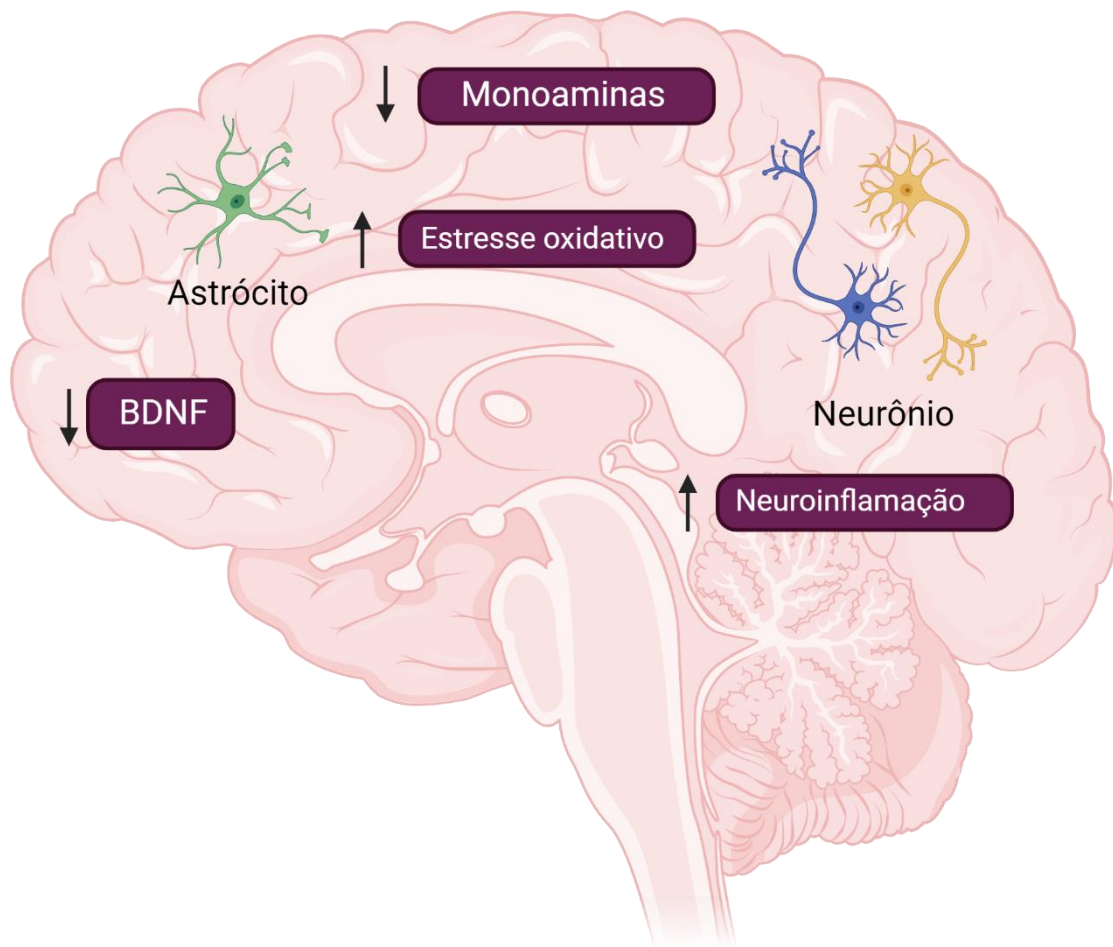
consequentemente, efeitos como o comportamento depressivo. Tal desequilíbrio fundamenta a hipótese neuroendócrina da depressão (JOHNSTON et al., 2023).

O estresse e a depressão possuem relação bidirecional entre causa e consequência, e são fatores preponderantes para outro efeito sistêmico, que é a redução dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e suas vias de sinalização, que é responsável por alterações neuroplásticas, que por sua vez leva à perda neuronal e diminuição da neurogênese no hipocampo e perda de células da glia, induzindo sintomas depressivos e trazendo à tona a hipótese da neuroplasticidade na etiologia da doença (CHAKRAPANI et al., 2020).

Importante ressaltar que o cérebro é um órgão de alta demanda metabólica, sendo assim, é comum a produção de radicais livres. Entretanto, pela complexa multifatorialidade da depressão, a produção em excesso dessas espécies reativas de oxigênio, está envolvida com a hipótese do estresse oxidativo, tanto como causa, como consequência do transtorno. O desbalanço do aumento espécies reativas, como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de nitrogênio, como nitrito, e a redução de defesa antioxidante, como a glutathiona reduzida (GSH), estimula alterações cerebrais, como a diminuição do volume hipocampal e no córtex pré-frontal; tais recorrências estão relacionadas com a depressão (BHATT et al., 2023; BLACK et al., 2015; CORREIA; CARDOSO; VALE, 2023).

Além do que já foi mencionado, é importante destacar que os processos inflamatórios têm ganhado bastante notoriedade dentro da fisiopatologia da depressão, devido à alta incidência e prevalência de doenças de cunho inflamatório que estão envolvidas em uma relação bidirecional de causa e consequência. As hipóteses da etiologia da depressão estão resumidas na Figura 1.

Figura 1 – Demonstração das hipóteses da etiologia da depressão.



Fonte: autoria própria

## 1.2 Neuroinflamação e depressão

A inflamação é uma resposta natural do corpo à toda e qualquer ameaça, e que envolve alta complexidade. Pode ser classificada como aguda, em que a resposta é imediata à lesão ou patógeno, ou como crônica, quando há uma recorrência e/ou persistência do estímulo, incentivando o corpo a continuar produzindo mediadores para combater às possíveis ameaças. Embora seja um mecanismo de defesa do organismo, a inflamação crônica pode causar diversas patologias, e afetar tanto sistema periférico quanto o Sistema Nervoso Central (SNC), no qual atinge o tecido cerebral, comumente denominada de neuroinflamação (SOCHOCKA; DINIZ; LESZEK, 2017).

Este termo refere-se ao processo imunológico que acontece no SNC após a exposição do sistema periférico às infecções ou até mesmo estressores psicológicos e/ou físicos. Assim, células imunes inatas do SNC, como astrócitos e micróglia, são ativadas liberando citocinas e outros mediadores inflamatórios em resposta ao estímulo (Figura 2) (LEONARD, 2018).

A exposição ao ambiente externo possibilita o contato com diversos fatores que vulnerabiliza o sistema fisiológico, permitindo o desequilíbrio homeostático. Uma das sinalizações desse acontecimento é caracterizado pelas doenças. Estas, por sua vez, é uma resposta natural do corpo para protegê-lo de infecções, exposições químicas, lesões físicas, ou condições neurológicas, como a depressão (ROE, 2020).

Dentre os biomarcadores para mensurar os níveis de inflamação, a produção de citocinas é uma das utilizadas em estudos, visto que concentração periférica de citocinas estão ligadas à função cerebral, ao bem estar e a cognição, e o excesso tem sido relacionado com pacientes com sintomas deprimidos (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020; XIE et al., 2023).

As citocinas IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, interferon-gama (IFN $\gamma$ ), dentre outras, têm sido marcadores frequentes no sistema periférico de pacientes com depressão. Além disso, doenças como obesidade, diabetes, hipertensão e aterosclerose têm atuado como fatores contribuintes para o aumento de citocinas pró-inflamatórias, além de serem distúrbios comórbidos, gerando um ciclo patológico no qual doenças inflamatórias contribuem para depressão e vice-versa. Estudos têm demonstrado que os sintomas de depressão e ansiedade como comorbidade, além de déficits cognitivos, são induzidos pela modificação de vias inflamatórias (BHATT et al., 2023; DOWLATI et al., 2010).

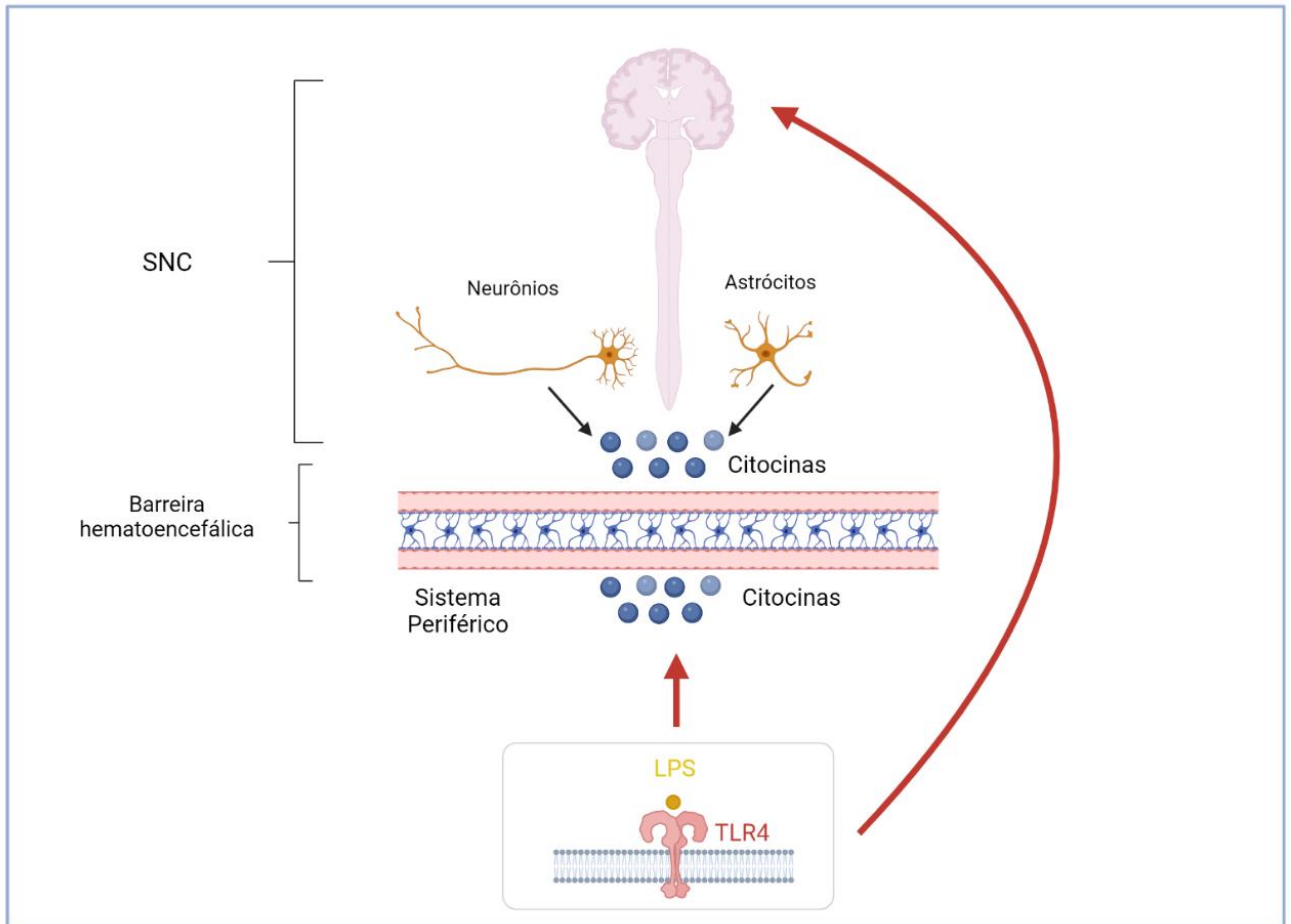
Dentre as principais doenças neurológicas ocasionadas por uma inflamação crônica, podem ser mencionadas as doenças neurodegenerativas como: esclerose múltipla, Alzheimer, Parkinson e Huntington, assim como as doenças neuropsiquiátricas como o transtorno

depressivo e transtornos associados à ansiedade. Um processo infeccioso geralmente é caracterizado pela exposição do corpo aos patógenos, o que desencadeia a ativação do sistema imune, ocasionando muitas reações celulares. Quaisquer que sejam o antígeno, o corpo é capaz de reconhecer de acordo com o mecanismo molecular pertencente aos receptores das células. Quando há uma infecção por bactérias gram-negativas, por exemplo, elas são prontamente reconhecidas devido a um componente presente em sua membrana externa, denominado lipopolissacarídeo (BROWN; CAMACHO; WILLIAMS-GRAY, 2023).

A esclerose múltipla é a doença neuroinflamatória e neurodegenerativa mais prevalente. Sua causa está associada, dentre outras características, com a desmielinização neuronal e pode ser ocasionada por um indutor inflamatório como o Lipopolissacarídeo (LPS) (FLEISHER-BERKOVICH et al., 2023; KIRICHENKO et al., 2023). O Alzheimer é uma doença de grande impacto na sociedade caracterizada pelo declínio cognitivo e demência, que, dentre muitos outros fatores que contribuem a patogênese, destaca-se a neuroinflamação (DECANDIA et al., 2023).

Estudos mostram, cada vez mais, a relação entre alterações neurológicas e a ativação imune, o que tem despertado a investigação dessa interação para permitir cada vez mais uma terapia direcionada e eficaz (LEE et al., 2019).

Figura 2 – Conexão entre Sistema Nervoso Central, sistema periférico e a produção de citocinas inflamatórias.



Fonte: autoria própria

### 1.3 Lipopolissacarídeo (LPS)

O lipopolissacarídeo, abreviadamente denominado LPS, possui uma alta massa molecular e pode ser classificado como um grande polímero oligossacarídeo. O LPS é constituído pelo lipídeo A, no qual apresenta entre 4 a 8 cadeias de ácido graxos ligados a um dissacarídeo fosforilado, uma cadeia de polissacarídeos central considerado o “núcleo”, e o antígeno-O, que consiste em uma variação de uma longa cadeia lateral de açúcares. Além disso, ele é caracterizado de acordo com as características bioquímicas da parede celular das espécies de bactérias gram-negativas a qual remete (KALYAN et al., 2022; RAETZ; WHITFIELD, 2002).

O LPS é liberado tanto por bactérias vivas, quanto mortas, e ao ligar-se às células hospedeiras, são capazes de induzir uma resposta imune. O lipídeo A é o componente do LPS que é considerado como uma endotoxina, e sozinho ele é capaz de ativar o sistema imune inato. Ele pode ativar mediante ligação direta ao receptor do tipo “*toll-like 4*” (TLR4) e a mediação através da proteína de ligação ao LPS (LBP) que solubiliza o LPS, e encarrega-se de levar ao receptor de CD14, uma proteína extrínseca, e por fim, a ativação ao complexo receptor TLR4-MD2 presente na membrana das células do hospedeiro. A resposta imune adaptativa e a produção de anticorpos, é gerada para o antígeno-O no decorrer da infecção (BROWN; CAMACHO; WILLIAMS-GRAY, 2023; BRYANT et al., 2010).

Importante destacar que, apesar de existir variabilidade entre as espécies de bactérias gram-negativas, a maioria delas possui composição do Lipídeo A similar à *Escherichia coli*, ou seja, seis cadeias de ácidos graxos ligados ao dissacarídeo fosforilado, e essa composição apresenta um perfil imunoestimulatório muito potente, podendo induzir inflamação sistêmica, além de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo sistema imune adaptativo (BRYANT et al., 2010; LU; YEH; OHASHI, 2008).

De forma geral, o mecanismo de ação do LPS, ativando o receptor TLR4 e as proteínas acopladas a ele é vista como benéfica, pela necessidade de haver uma resposta imune rápida a fim de combater infecções. Entretanto, a hiperativação desse receptor ocasiona uma resposta imune crônica, e tal evento pode gerar alterações inflamatórias no organismo, acometendo patologias, danos teciduais e reduzindo o combate natural pelo próprio corpo (BROWN; CAMACHO; WILLIAMS-GRAY, 2023).

A exposição crônica ao LPS de *Escherichia coli* causa inúmeras consequências no organismo, uma delas é a neuroinflamação, sendo fator estimulatório para doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e Huntington (BROWN; CAMACHO;

WILLIAMS-GRAY, 2023; LITKE et al., 2023). Além das doenças de cunho neurodegenerativo, é importante destacar que a inflamação crônica está associada à incidência dos transtornos do humor, como a depressão e a ansiedade. Estas, têm sido causa de preocupação para a saúde pública por proporcionar incapacidade, prejuízos na qualidade de vida, podendo em alguns casos levar ao suicídio (GUO et al., 2023).

Assim, demonstrou que a hipótese inflamatória está associada às outras hipóteses para a depressão, tornando interessante o estudo de substâncias com potencial anti-inflamatório como tratamento, ou tratamento adjuvante para esse distúrbio neuropsiquiátrico, visto que o tratamento atual para essa doença confronta com algumas limitações como o tempo de latência, a remissão de muitos pacientes, a presença de muitos efeitos adversos, contribuindo para baixa adesão ao tratamento e dificuldade de eficácia terapêutica.

#### **1.4 Potencial neuroprotetor do alfa-bisabolol**

O tratamento farmacológico com antidepressivos, de forma geral, é eficaz aos sintomas. Entretanto, há resistência na aderência, pelos pacientes, devido alguns fatores limitantes como: alto período de latência para início do efeito e muitos efeitos adversos. Dessa forma, há a busca incessante de alternativas terapêuticas que visem à qualidade de vida do paciente. Nesse contexto, tem-se visto cada vez mais estudos com compostos extraídos do óleo essencial de plantas, como os terpenos (KOYAMA; HEINBOCKEL, 2020).

Terpenos ou terpenoides, são compostos de hidrocarbonetos, no qual podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química em: monoterpenos, sesquiterpenos e tetraterpenos. Dos terpenos mais conhecidos estão o linalol, geraniol, limoneno, carotenoides e levomenol (também conhecido como alfa-bisabolol). A importância destes compostos é devido ao vasto potencial farmacológico como anti-inflamatório, anti-apoptótico, anti-microbiano, ansiolítico, antidepressivo e neuroprotetor (AZIZI et al., 2022; EDDIN et al., 2022; KOYAMA; HEINBOCKEL, 2020; NADI et al., 2023; WESTON-GREEN; CLUNAS; JIMENEZ NARANJO, 2021).

A camomila alemã (*Matricaria chamomilla*) é uma das plantas mais utilizadas para diferentes fins terapêuticos. Suas propriedades devem-se ao potencial do óleo essencial extraído de suas flores, no qual há como composto majoritário o alfa-bisabolol. Este, trata-se de um álcool sesquiterpênico monocíclico que tem sido utilizado em diversos produtos farmacológicos principalmente pelas suas propriedades anti-inflamatórias (TAI et al., 2023).

Conhecido também como levomenol, o  $\alpha$ -bisabolol apresenta fórmula química  $C_{15}H_{26}O$ , baixo odor floral adocicado, sem coloração, baixo peso molecular e insolúvel em água, portanto, lipofílico. Além da camomila, o alfa-bisabolol pode ser extraído de outras plantas por hidrodestilação, e foi isolado pela primeira vez em 1951. Ele pode ser encontrado na forma de quatro estereoisômeros: (-)- $\alpha$ -bisabolol, (-)- $\alpha$ -bisabolol, (+)- $\alpha$ -bisabolol e (+)- $\alpha$ -bisabolol. Entretanto, o (-)- $\alpha$ -bisabolol será o mais abordado por apresentar as características de potencial farmacológico, sendo abreviado como  $\alpha$ -bisabolol (SOUZA et al., 2020).

O  $\alpha$ -bisabolol (BIS) possui muitas atividades biológicas descritas, como por exemplo, função anti-bacteriana e antioxidante, proteção renal, antineoplásica, anti-inflamatória, antidepressiva em um modelo de estresse crônico imprevisível e neuroprotetora em um modelo de Alzheimer diabético (ARUNACHALAM et al., 2022a, 2022b; CAVALCANTE et al., 2020; KIM et al., 2023; MADESWARAN; MOHAN, 2023; REBOUÇAS, 2019; SAMPAIO et al., 2019).

Dentre o vasto potencial do BIS, seu efeito anti-inflamatório tem despertado interesse para diversos fins, como por exemplo, para doenças que afetam o SNC, visto que a hipótese inflamatória para doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas tem ganhado força e emergido a necessidade de explorar compostos com potencial anti-inflamatório. Entretanto, os mecanismos moleculares seguem sendo alvo de estudo para melhor elucidar os efeitos terapêuticos (FERNANDES et al., 2019; JAVED et al., 2020; SATHYA; SHANMUGANATHAN; DEVI, 2020).

## 1.5 Efeito anti-inflamatório do $\alpha$ -bisabolol e seus possíveis alvos moleculares

Compreender a forma como uma substância age, ou seja, entender seu mecanismo molecular, é uma das características cruciais para justificar sua atividade biológica. O efeito anti-inflamatório do  $\alpha$ -bisabolol é relevante para aprofundar o seu estudo em diversas patologias, incluindo as que acometem o SNC.

O processo inflamatório engloba uma série de respostas celulares, incluindo seus receptores e transduções de sinais. Um mecanismo chave responsável pela sinalização da inflamação, é o Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que desempenha papel importante quanto à ativação de citocinas pró-inflamatórias, como  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ . Estudos mostram que a ativação excessiva dessa via do PI3K gera desregulação no sistema imunológico podendo desencadear alguns distúrbios (CHEN; YAO; HUANG, 2017; WU et al., 2023c).



A ativação da via de sinalização do PI3K induzida pelo LPS foi capaz de promover sintomas do tipo depressivo em camundongos machos e de promover inflamação em macrófagos. Em contrapartida, a inibição da via por substâncias com potencial anti-inflamatório foi capaz de reverter os sintomas, assim como reduzir a fatores inflamatórios nas células (LI et al., 2023a; TAO et al., 2023). Um estudo utilizando o óleo essencial de camomila, no qual apresenta o BIS como composto majoritário, mostrou potencial inibição da via do PI3K, sugerindo que essa ação pode ter relação com esse composto (AN et al., 2023).

O LPS ao ativar o receptor TLR4 causa ativação transcricional dependente de NF- $\kappa$ B induzindo a liberação de muitas citocinas pró-inflamatórias. Terapias que visam a redução do LPS ou da inflamação mediada por ele são vistas como potenciais tratamentos para patologias incluindo as relacionadas à neuroinflamação (BROWN; CAMACHO; WILLIAMS-GRAY, 2023; KALYAN et al., 2022).

A heme oxigenase- 1 (HO-1) é uma enzima anti-inflamatória e antioxidante responsável por manter em equilíbrio as citocinas inflamatórias. Porém, a exposição ao LPS permite que haja uma depleção desta enzima, acentuando muitas doenças. A reversão desse quadro pode ser visualizado com substâncias anti-inflamatórias (WU et al., 2023a). O  $\alpha$ -bisabolol abrange muitas características que possam atuar nas vias do PI3K, TLR4 e/ou HO-1 a fim de justificar seu efeito anti-inflamatório e, conseqüentemente, neuroprotetor, necessitando de investigação.

## 2. JUSTIFICATIVA

A resposta do corpo à uma ameaça, seja de caráter físico ou psicológico, faz parte da sua natureza fisiológica, e o processo inflamatório possui papel crítico para garantia da homeostase. Entretanto, o aumento exacerbado de fatores pro-inflamatórios demonstra desbalanço e consequentemente a incidência de doenças. Dentre as diversas patologias relacionadas com a inflamação, é relevante destacar as de cunho neuropsiquiátrico (HUANG; HUSSAIN; CHANG, 2021)

A Depressão tem sido, principalmente dentro do contexto pós-pandêmico, uma doença de alta incidência e prevalência, o que causa preocupação para a saúde pública, devido à incapacitação das pessoas acometidas (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020; LAKHAN; AGRAWAL; SHARMA, 2020). Apesar de muito disseminada e de conhecimento público, a Depressão ainda é uma doença estigmatizada e há uma resistência por parte de alguns pacientes em aceitar o tratamento. Parte desta resistência está relacionada aos efeitos adversos de alguns fármacos, como alteração de peso, apetite e sono, o alto período de latência para chegar no efeito terapêutico, e a falta de esclarecimento, levando à falsa ideia de dependência.

Devido às limitações supracitadas, dentre outras, é importante explorar alternativas de tratamentos terapêuticos que reduzam os efeitos adversos causados pelos fármacos atuais do mercado, e encorajar os pacientes a relevância de efetuar o tratamento adequado. Dentro dessa linha de busca, o (-)- $\alpha$ -bisabolol, álcool sesquiterpênico lipofílico, e que apresenta propriedades bem destacadas na literatura, como anti-inflamatória, antinociceptiva, neuroprotetiva, dentre outras, emerge como uma opção relevante para o estudo direcionado da neuroinflamação concatenada com doenças neuropsiquiátricas, a fim de buscar esclarecimento dos mecanismos moleculares relacionados e possíveis tratamentos efetivos (RAMAZANI et al., 2022).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito neuroprotetor do  $\alpha$ -bisabolol e seu mecanismo de ação após exposição ao lipopolissacarídeo bacteriano, e investigar virtualmente alvos moleculares relacionado ao mecanismo de ação.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito antidepressivo, ansiolítico e na memória de curto prazo do  $\alpha$ -bisabolol em camundongos C57BL/6 submetidos à administração crônica de LPS;
- Mensurar citocinas pró-inflamatórias em hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos tratados com  $\alpha$ -bisabolol e expostos à administração crônica de LPS;
- Verificar espécies reativas de oxigênio em hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos tratados com  $\alpha$ -bisabolol e expostos à administração crônica de LPS;
- Avaliar o efeito do  $\alpha$ -bisabolol sobre a viabilidade de células nervosas;
- Verificar a ação do  $\alpha$ -bisabolol sobre a morte celular em células previamente expostas ao LPS;
- Analisar o potencial do  $\alpha$ -bisabolol sobre citocinas pró-inflamatórias em células desafiadas com o LPS;
- Investigar a intervenção do  $\alpha$ -bisabolol no potencial transmembrânico mitocondrial e na produção de espécies reativas de oxigênio em células submetidas ao LPS;
- Verificar o efeito do  $\alpha$ -bisabolol sobre as alterações morfológicas induzidas pela exposição ao LPS;
- Relacionar os efeitos neuroprotetores do  $\alpha$ -bisabolol com a possível interação com os receptores: TLR4, PI3K e HMOX.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 $\alpha$ -bisabolol

O  $\alpha$ -bisabolol foi obtido da Sigma®, St. Louis, USA, e armazenado segundo as orientações do fabricante. Para o tratamento dos animais, o  $\alpha$ -bisabolol foi diluído em 3% de Tween® 80 com solução salina 0,9% para obter a dose de 50mg/kg por via oral. A escolha da dose deveu-se a estudos anteriores do presente grupo de estudo (REBOUÇAS, 2019).

Para os testes *in vitro*, o BIS foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,2 M para obter uma solução-estoque. Em seguida as soluções preparadas para os experimentos foram diluídas de forma seriada em solução salina tampão fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; ph 7,4) a fim de obter as concentrações 1000  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M 62,5  $\mu$ M e 31,25  $\mu$ M. Importante ressaltar que a concentração final do DMSO não ultrapassou 0,5%, concentração não tóxica para as linhagens celulares. A escolha das concentrações foi dada a partir de estudo anterior do grupo de estudo (SAMPAIO et al., 2016).

### 4.2 Lipopolissacarídeo

Para indução de inflamação sistêmica, foi utilizado o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA). A dose administrada nos animais foi de 0,5mg/kg, por via intraperitoneal, dissolvido em solução salina estéril 0,9%. A escolha da dose foi baseada de acordo com estudos anteriores do presente grupo (MELLO, 2021).

As células foram expostas ao LPS na concentração de 50 $\mu$ g/ml dissolvido em solução salina tampão fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; ph 7,4). A concentração foi definida previamente baseada na literatura (ZHAO et al., 2023a, 2019).

### 4.3 Escitalopram e Dexametasona

A substância utilizadas para o controle nos testes *in vivo* foi o antidepressivo escitalopram (ESC; Lexapro®, H.Lundbeck A/S Dinamarca) e como controle anti-inflamatório foi a dexametasona (DEX; SEM). Foram diluídos em solução salina 0,9%, ESC (10mg/kg) e

DEX (2mg/kg) e administrados por via oral durante 5 (cinco) dias consecutivos. As doses foram definidas com base em estudos anteriores com modelo animal (SZKLARCZYK et al., 2016; DE SOUSA TOMAZ et al., 2020). Nos testes *in vitro* não utilizou-se substâncias controles, visto que o objetivo foi verificar o perfil modulatório apenas do BIS nas linhagens testadas quando submetidas ao LPS.

#### **4.4 Testes *in vivo***

##### **4.4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos, com peso entre 15-25g provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Eles foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), em ciclo de claro/escuro (12/12h), recebendo água e comida à vontade, exceto no período de teste que demanda restrições.

Os experimentos foram realizados conforme os princípios éticos de experimentação animal, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, sob o número: 3228090320, apresentado em Anexo A.

##### **4.4.2 Delineamento experimental**

O protocolo experimental foi proposto para avaliar os efeitos da administração do  $\alpha$ -bisabolol em um modelo animal de inflamação através da exposição sistêmica ao lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. (MELLO et al., 2017). Durante dez dias, no período da manhã, foi administrado via intraperitoneal (i.p), injeções de lipopolissacarídeo 0,5mg/kg.

A partir do sexto (6<sup>o</sup>) dia, iniciou-se o tratamento por via oral (v.o), com salina,  $\alpha$ -bisabolol, escitalopram ou dexametasona, após 60 minutos da administração do LPS. O delineamento experimental está representado na Figura 3. Os grupos, contendo 8-10 animais cada, estão representados a seguir:

- CONTROLE: animais receberam injeções i.p de solução salina 0,9% durante dez dias e do 6<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> receberam a mesma solução por via oral.

- LPS + SAL: foram tratados com LPS (0,5mg/kg i.p) durante dez dias. Do 6<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> receberam solução salina 0,9% por via oral.

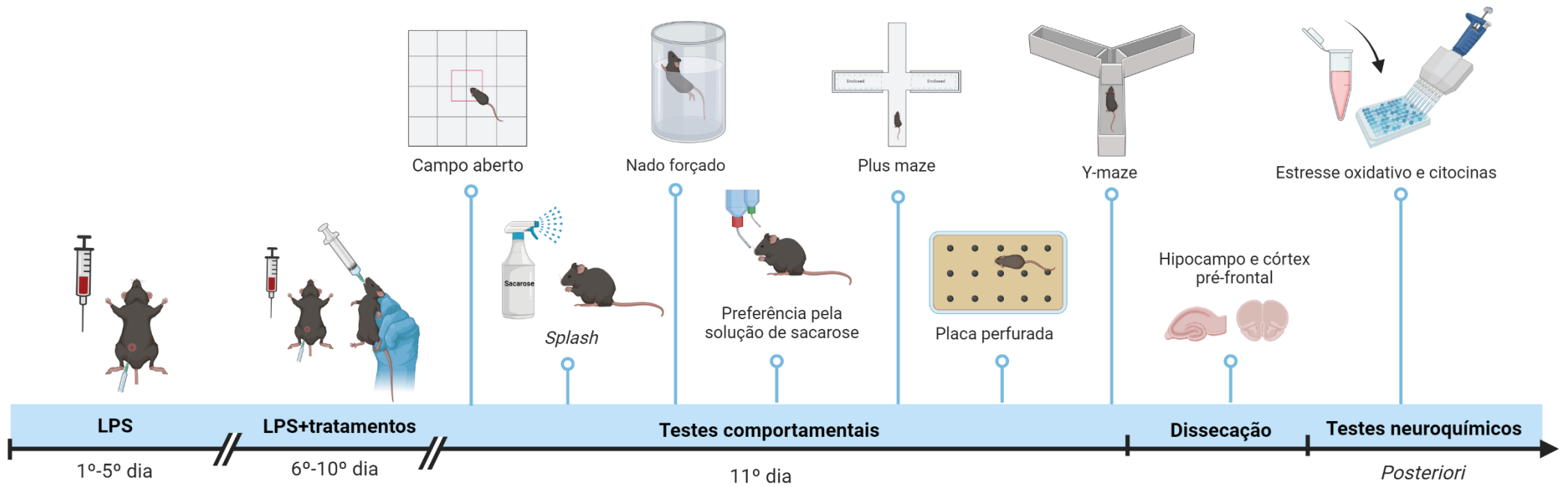
- LPS + BIS: receberam LPS (i.p) durante dez dias. Do 6<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> foram administrados com  $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg) por via oral.

- LPS + ESC: receberam LPS (i.p) durante dez dias. Do 6º ao 10º foram administrados com escitalopram (10mg/kg) por via oral.

- LPS + DEX: receberam LPS (i.p) durante dez dias. Do 6º ao 10º foram administrados com dexametasona (2mg/kg) por via oral.

No 11º (décimo primeiro) dia, os animais foram submetidos aos testes comportamentais a fim de avaliar o efeito das substâncias administradas durante os 10 dias, e em seguida, foram eutanasiados e as áreas cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal) preservadas para testes neuroquímicos posteriores.

Figura 3 – Linha experimental do modelo *in vivo* durante 10 dias de administração de LPS e 5 dias de tratamento com as substâncias testes. LPS: Lipopolissacarídeo;



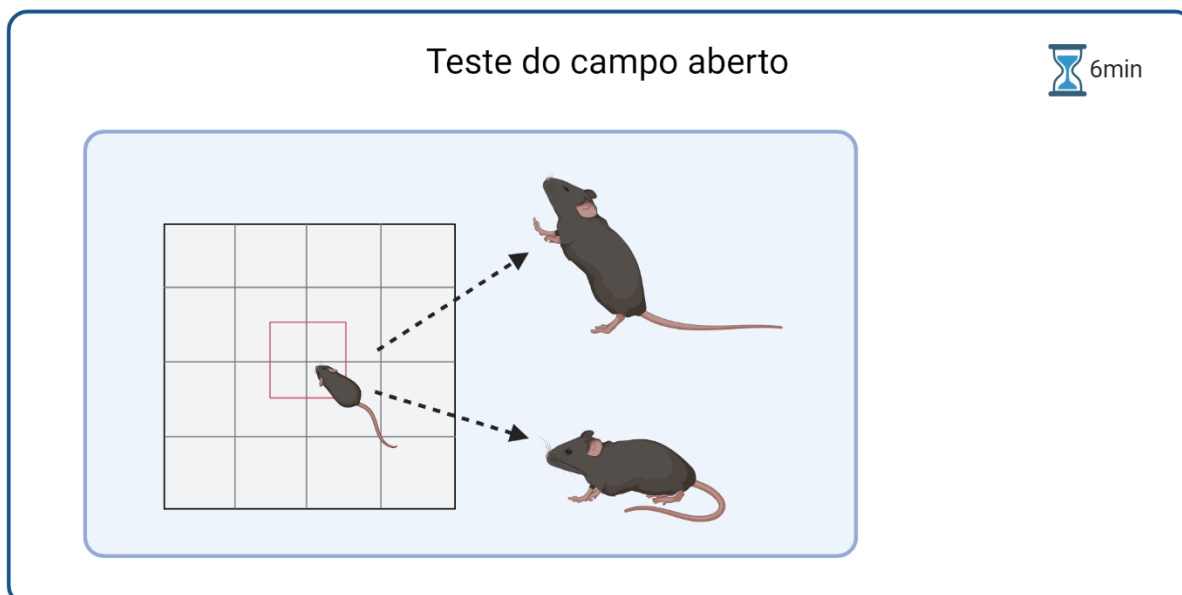
Fonte: Autoria próp

### 4.4.3 Testes comportamentais

#### 4.4.3.1 Campo aberto

O teste do campo aberto (OFT) consiste em um aparato quadrangular (32cm x 32cm), no qual cada animal foi submetido, individualmente, no centro e passou 5 minutos explorando livremente o espaço. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos (*crossing*), número de levantamento vertical (*rearing*), número de entradas na zona central e na zona periférica, e o tempo gasto em cada zona, e por fim, analisado o trajeto e mapa de calor para corroborar com os resultados numéricos. O aparelho foi totalmente limpo com solução de álcool diluído após a troca de cada animal. O teste foi gravado e analisado no *software Anymaze*. (CHEM et al., LIT et al., ARCHER 1973) (Figura 4).

Figura 4 – Teste do Campo aberto



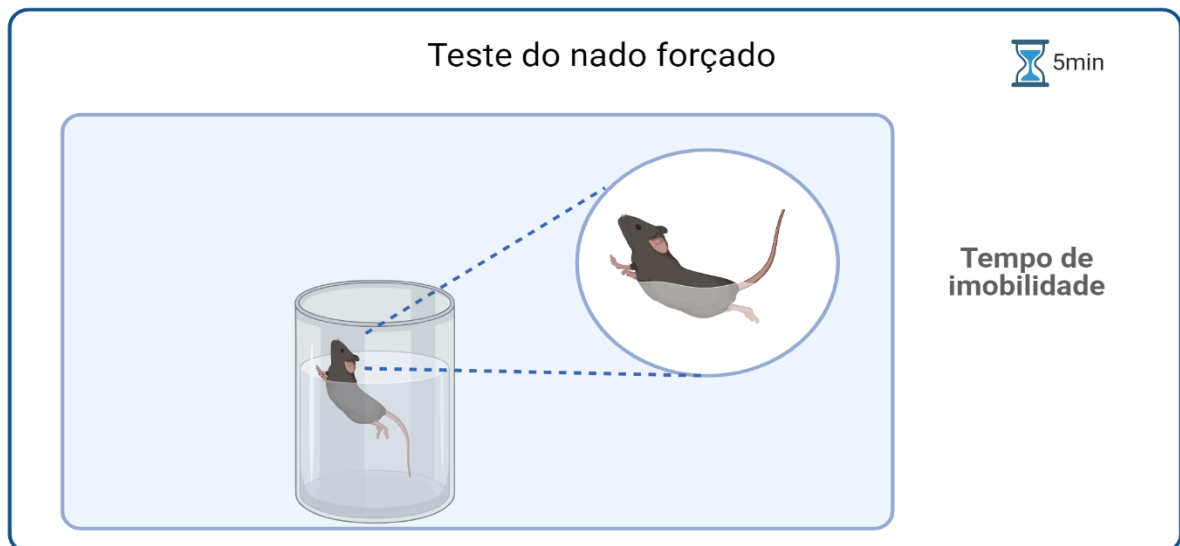
Fonte: autoria própria



#### 4.4.3.2 Teste do Nado forçado

O teste do nado forçado é considerado um teste padrão ouro para averiguar o comportamento depressivo-símile em roedores. Trata-se de um teste no qual consiste submeter o animal individualmente em cilindros de acrílico contendo água (altura: 35 cm; diâmetro: 24 cm) com temperatura entre 25-27°C, durante 5 minutos, evitando o desconforto. O teste avalia o comportamento de desesperança e/ou desmotivação do animal, mensurado pelo tempo de imobilidade, considerado este parâmetro quando o animal faz apenas movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. (PORSOLT et al., 1978) (Figura 5).

Figura 5 – Teste do Nado Forçado

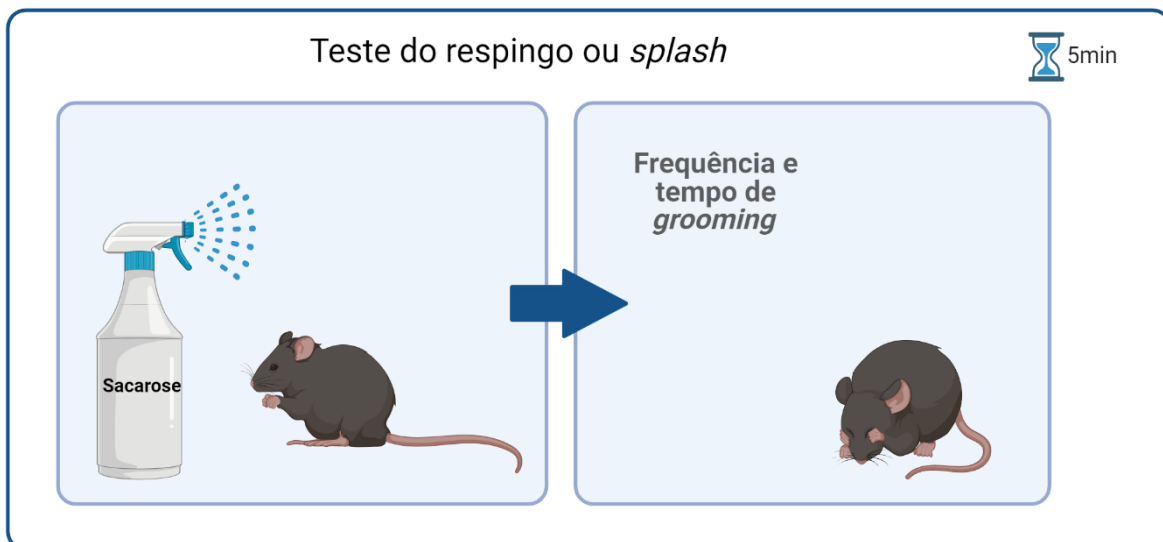


Fonte: autoria própria

#### 4.4.3.3 Teste do respingo de sacarose ou “*Splash*”

Uma solução de sacarose a 10% foi esguichada sobre a pelagem dorsal de cada camundongo que foi submetida individualmente em uma caixa transparente. A viscosidade da solução de sacarose interfere na pelagem, denotando sujeira, e como resposta, os animais tendem a realizar a medida de autolimpeza, denominada *grooming*. Entende-se que a redução desse comportamento representa desmotivação, comparativo à depressão. O teste durou 5 minutos após a solução ser aplicada, e foram avaliados a frequência de *groomings*, e o tempo total de *grooming*. Para evitar vieses, a cada animal o aparato foi limpo com etanol a 10% (Figura 6)(FAWZI et al., 2024; KONG et al., 2023).

Figura 6 – Teste do respingo ou *splash*



Fonte: Autoria própria

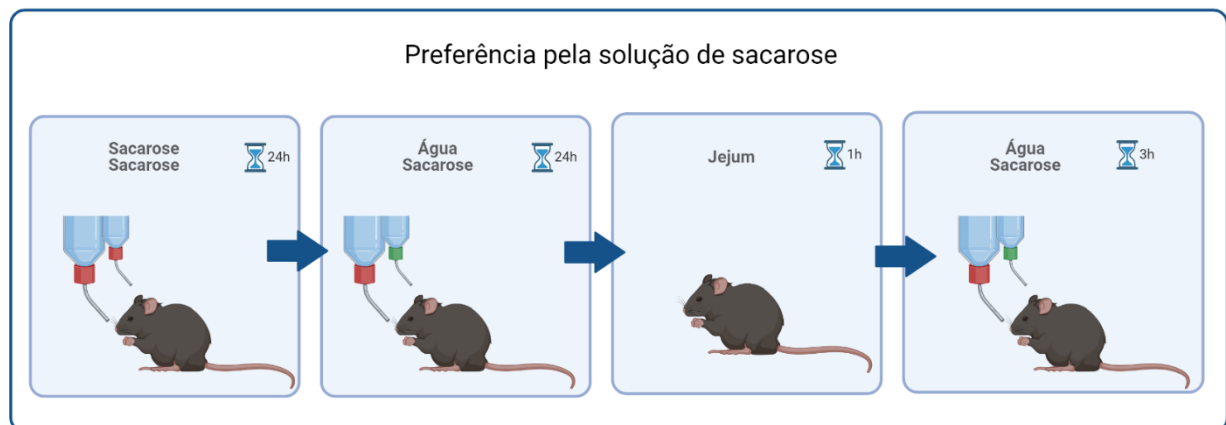
#### 4.4.3.4 Teste de preferência pela solução da sacarose

Para a avaliação do comportamento do tipo anedonia, foi realizado o teste de preferência por sacarose (WU et al., 2023b). Anedonia é representada pela incapacidade de sentir prazer, nesse teste é representado pela solução de sacarose, na qual a redução da preferência dos animais pela sacarose é entendida como um comportamento depressivo-símile.

Os camundongos passaram inicialmente por uma fase de adaptação, que consistiu em submeter os animais à duas garrafas de solução de sacarose a 2% durante 24h, seguido pela substituição de uma das garrafas por água por mais 24h. Após a adaptação, todos os animais foram privados de água e comida por 1 hora. Após o período de jejum, os animais foram inseridos em gaiolas individuais e expostos à duas garrafas, uma contendo 2% de solução de sacarose e água na outra (o volume previamente mensurado).

O teste durou 3h, e após esse tempo, os volumes de solução de sacarose e água consumida foram registrados. A preferência pela sacarose foi calculada como a quantidade de solução de sacarose consumida como uma porcentagem da quantidade total de ingestão de líquido, seguindo a seguinte fórmula:  $\frac{\text{consumo de sacarose}}{(\text{consumo de água} + \text{consumo de sacarose}) \times 100}$  (Figura 7).

Figura 7: Teste de preferência pela solução de sacarose.



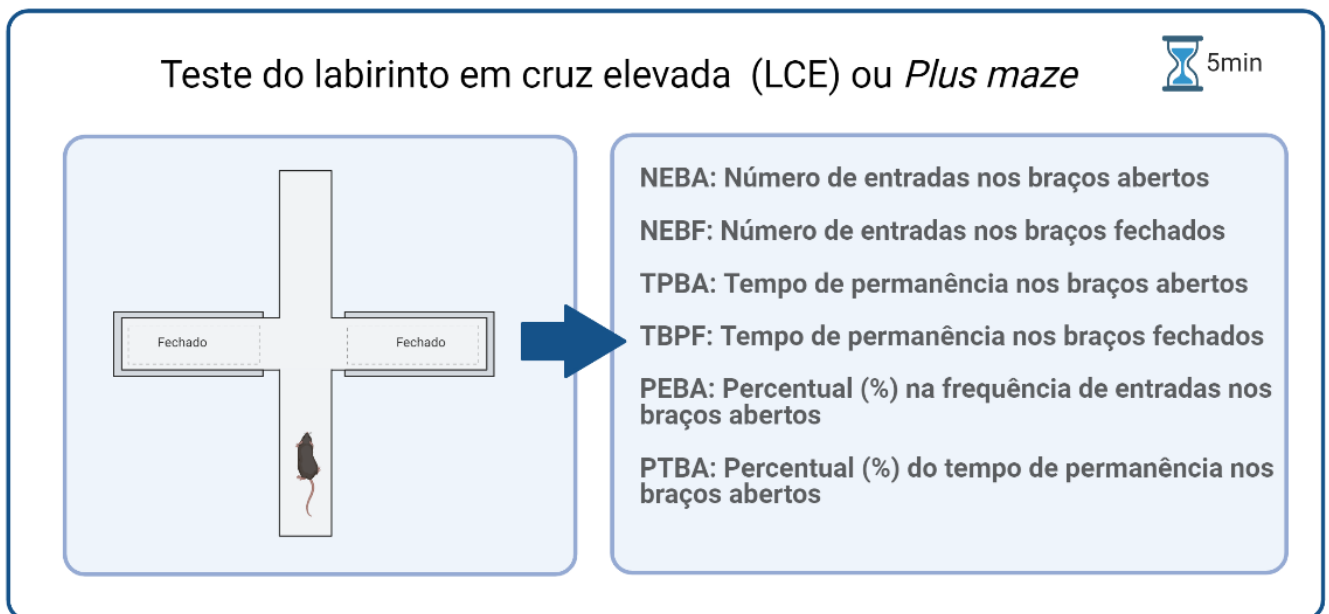
Fonte: Autoria própria

#### 4.4.3.5 Teste do Labirinto em cruz elevada

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), também denominado de *Plus maze*, é um teste que avalia o comportamento ansioso dos animais, visto que consiste em um aparato elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão composto de dois braços abertos e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) opostos entre si, em forma de cruz, conectados por uma plataforma central (5 x 5cm). Neste teste os camundongos foram colocados no centro do aparato com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min (LISTER, 1987). Naturalmente, os animais tendem a buscar segurança nos braços fechados, portanto aqueles que passaram maior tempo nestes foi considerado com comportamento de ansiedade-símile.

As medidas comportamentais registradas no LCE foram: número de entradas nos braços abertos (NEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), número de entradas nos braços fechados (NEBF) e tempo de permanência nos braços fechados (TPBF), e a partir dessas informações, são medidos os percentuais do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) e do número de entradas nos braços abertos (PEBA) a partir da fórmula: PEBA:  $\frac{NEBA \times 100}{(NEBA+NEBF)}$ ; PTBA:  $\frac{TPBA \times 100}{(TPBA + TPBF)}$  (Figura 8).

Figura 8 – Teste do labirinto em cruz elevada ou *Plus maze*

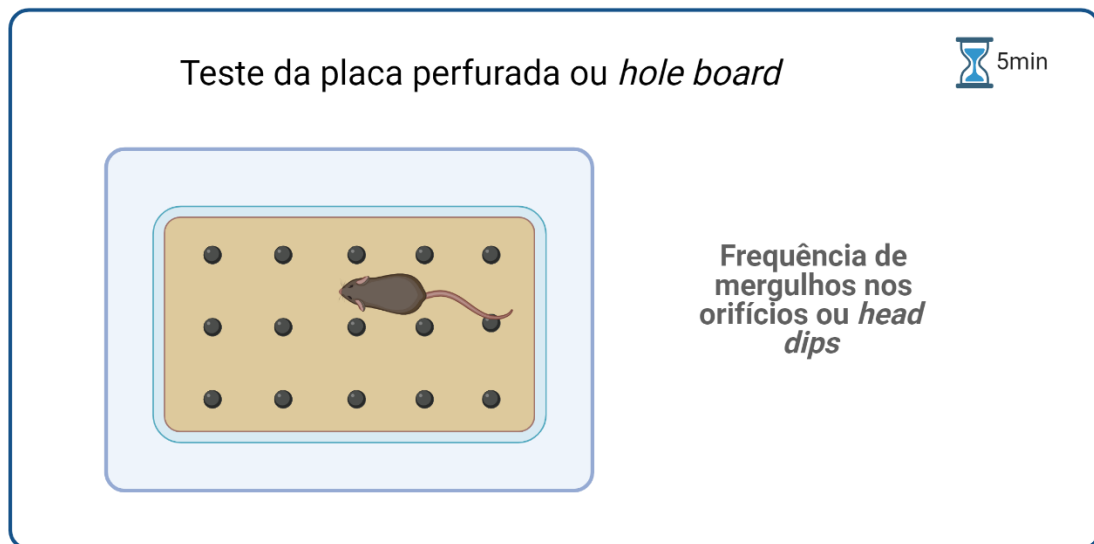


Fonte: autoria própria

#### 4.4.3.6 Teste da placa perfurada

O teste da placa perfurada, utilizado para avaliar o comportamento exploratório em camundongos foi o proposto por File e Wardill, (1975). Este teste apresenta um aparato quadrangular de 20 x 20 cm com 16 orifícios espaçados uniformemente, suspenso a uma altura de 45cm aproximadamente. Durante 5 minutos foi avaliado, individualmente, a frequência em que o animal colocou a cabeça dentro dos orifícios, também denominado de “mergulhos” ou *head dips*. Tal teste é importante para avaliar o comportamento ansioso dos animais, visto que os animais possuem medo de altura, e de locais abertos, dessa forma quanto maior a frequência de exposição aos orifícios, menor o comportamento ansioso-símile (Figura 9).

Figura 9 – Teste da placa perfurada ou *holeboard*

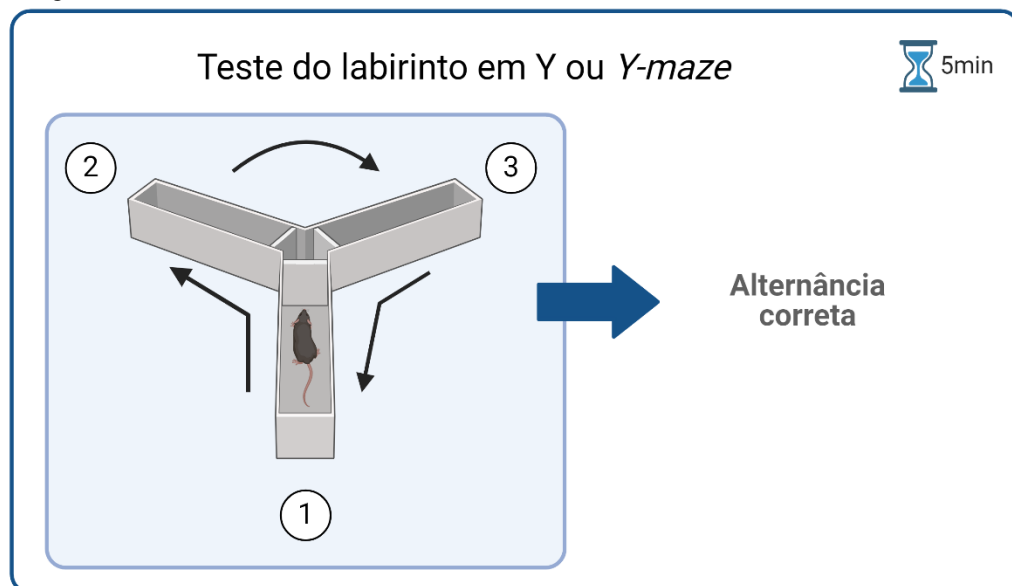


Fonte: autoria própria

#### 4.4.3.7 Teste do labirinto em Y

Este teste avalia a memória a curto prazo, também denominada de memória de trabalho. O labirinto em Y é composto por 3 braços 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento. Neste teste, o animal foi colocado em um dos braços e foi realizada a notificação em cada braço entrado, durante 5 minutos. O intuito do teste é verificar se o animal, ao entrar em um dos braços, relembrar-se-á do braço previamente explorado. Os dados foram expressos:  $\text{ALTERNÂNCIAS CORRETAS} / \text{NÚMERO TOTAL DE ENTRADAS} \times 100$ . A alternância correta considerada é aquela na qual não se repete em um contexto de três entradas (LALONDE, 2002)(Figura 10).

Figura 10 – Teste do labirinto em Y



Fonte: autoria própria

#### 4.4.4 Testes neuroquímicos

Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação, e as áreas cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal) foram dissecadas e armazenadas em freezer - 80°C para a realização dos testes posteriores.

##### 4.4.4.1 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

Foi realizado o teste de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), para avaliar o grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais, e a mensuração dos níveis de nitrito. As amostras foram preparadas através do homogenato a 10% de tampão fosfato de potássio monobásico, 50 mM, pH 7,4. Para o teste de TBARS, 63µL destes foram adicionados a 100 µL de ácido perclórico 35% em tubos *ependorf*, que foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida 150 µL do sobrenadante foram adicionados a 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, que ficaram em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Por fim, 150 µL da mistura foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços, e, posteriormente, foi feita a leitura a 535nm (DRAPER, 1990).

Para a dosagem de nitrito 100 µL do Reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%, NEED 0,1% e água destilada) foram adicionados a 100 µL do sobrenadante do homogenato e incubados a temperatura ambiente por 10 min (GREEN et al., 1982) A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do Reagente de Griess a 100 µL do tampão usado para o homogenato (fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4). A absorbância foi medida em leitor de microplacas em 540 nm, e o resultado expresso em µmol de nitrito/g de tecido.

Os níveis de GSH foram avaliados para verificar a defesa antioxidante. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas cerebrais foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% p/v) e adicionadas à uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Em seguida, foram submetidas à centrifugação (3000 rpm/15 min. As amostras foram misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Os níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, e calculada com base em uma curva padrão de glutatona e expressos como µg de GSH/g de tecido (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

#### 4.4.4.2 Dosagem de citocinas

As áreas cerebrais dissecadas foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS com inibidor de protease (EMD Biosciences) para posteriormente serem centrifugadas (10000 rpm, 5 min) e utilizando sobrenadante da diluição. A concentração das citocinas IL1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  em 50  $\mu$ L de amostras, foi determinada por ELISA (R&D® Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e expressa em pg/g de tecido.

### 4.5 Testes *In vitro*

#### 4.5.1 Manutenção e cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas foram de feocromocitoma de rato, PC12 (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ, BRA) e de astrócitos murinos, isolada e atribuída pelo grupo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (ERUSTES et al 2018). Para cultivo, foram utilizadas garrafas polietileno (75cm<sup>2</sup>, volume de 250mL) no meio de cultura *dulbecco modified eagles minimal essential medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram incubadas na estufa com as seguintes condições: temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, e o crescimento foi observado, em microscópio de inversão, a cada 24 horas.

Ao atingir 80% de confluência, as células foram deslocadas utilizando tripsina 0,05% em EDTA 0.53mM. Ao suspender as células, estas foram contadas em hemocitômetro do tipo câmara de Neubauer e a densidade celular foi avaliada utilizando o corante de exclusão azul de Tripán, e posteriormente, sub-cultivadas em placas de 6 ou 24 poços a uma concentração de 5 x 10<sup>4</sup> células/ml ou em placas de 96 poços na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/ml variando de acordo com os procedimentos utilizados.

#### 4.5.2 Ensaio de citotoxicidade

Foi utilizado o ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade do  $\alpha$ -bisabolol, nas linhagens celulares (MOSMANN, 1983). Este teste baseia-se no potencial da succinato desidrogenase, uma enzima pertencente ao ciclo de Krebs, ativa em mitocôndrias e no citosol de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-



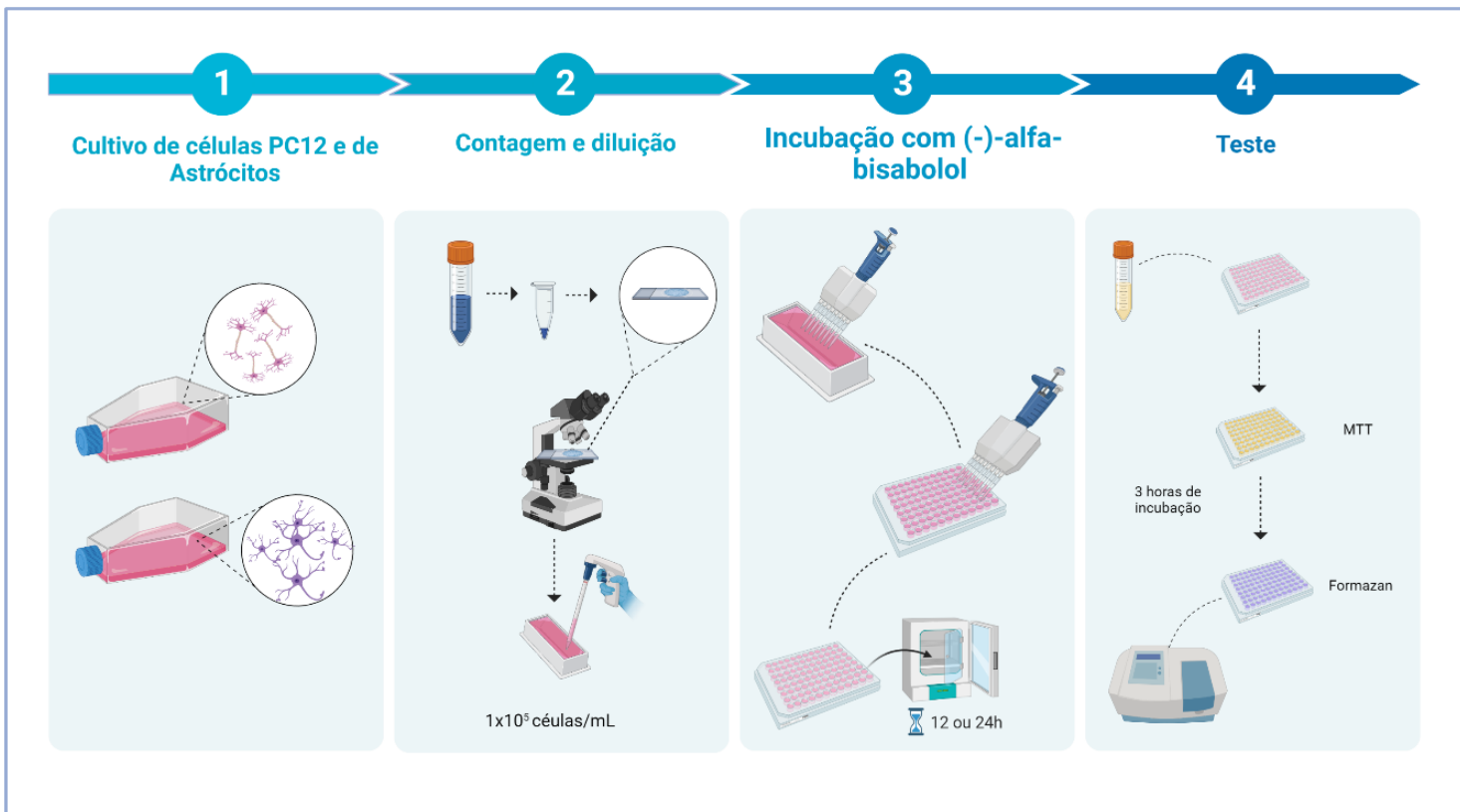
difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura (DENIZOT; LANG, 1986).

Nesse teste, o  $\alpha$ -bisabolol foi adicionado nas concentrações 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25  $\mu\text{M}/\text{mL}$  à cultura das duas linhagens celulares. Após 12 ou 24 horas de incubação, as células passaram 3 horas com um novo meio (200 $\mu\text{L}$ ) contendo 10% de MTT, na concentração de 5mg/mL em cada poço. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 $\mu\text{L}$  de DMSO puro, para submeter as células à lise e solubilização do formazan. Por fim, a placa foi colocada em agitador por 30 minutos, e levada para o leitor de microplacas para realização da medição da absorbância a 595nm (Figura 11). A viabilidade foi dada através do aumento da conversão do MTT, no qual considerou-se a média da absorbância do controle como 100%, enquanto os outros valores receberam valores proporcionais de acordo com a absorbância apresentada.

Para avaliar o potencial de dano do LPS foi realizado o teste de citometria de fluxo com a marcação de iodeto de propídeo (PI), no qual indica que está acontecendo um processo de morte celular.

Para executar a análise, as células foram suspensas em 100 $\mu\text{L}$  em tampão de ligação e em seguida adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de PI (0,5mg/mL). Após 15 minutos de incubação em ambiente sem luz, foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD Biosciences). Para análise dos resultados, foram consideradas as células não marcadas como viáveis e com iodeto de propídeo, em processo de morte celular (ROCHA et al., 2012).

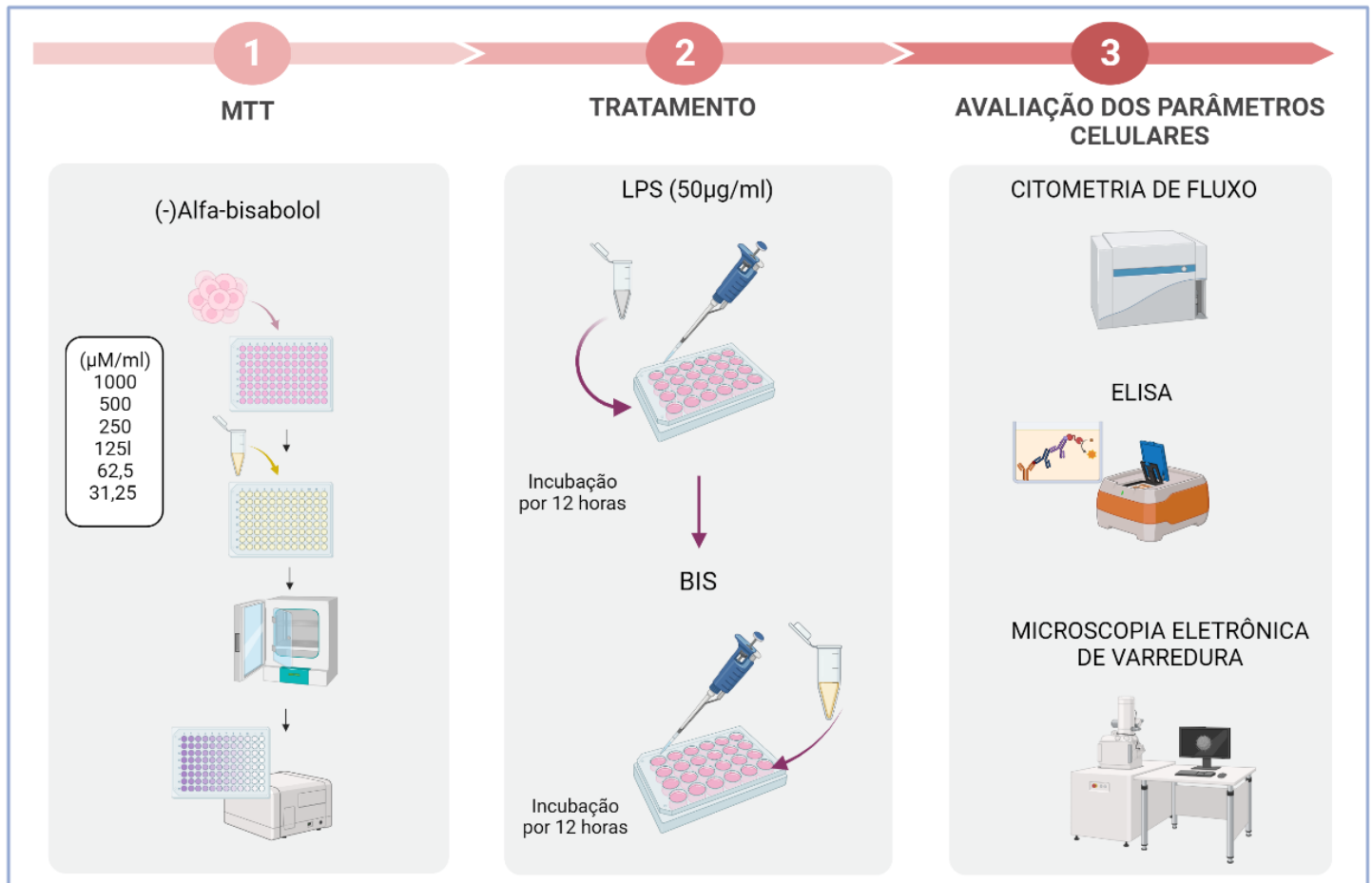
Figura 11 – Descrição em quatro etapas para a realização do teste de redução do MTT para avaliação da citotoxicidade do (-)- $\alpha$ -bisabolol.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.5.3 Delineamento experimental

O protocolo experimental foi proposto para avaliar o efeito neuroprotetor do  $\alpha$ -bisabolol nas células, após a exposição com o LPS. Assim, após ser avaliada a melhor concentração de  $\alpha$ -bisabolol a fim de verificar a viabilidade celular e a citotoxicidade das substâncias, as células foram submetidas ao tratamento com o LPS, durante 12 horas. Em seguida, foi realizado o tratamento com o BIS. As células permaneceram em contato com o LPS+BIS durante 12 horas e em seguida foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à morte celular, alteração na membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, e foram também avaliadas as citocinas pró-inflamatórias e a morfologia celular. O delineamento experimental está representado na Figura 12.

Figura 12 – Linha experimental do modelo *in vitro*.

Fonte: Autoria própria

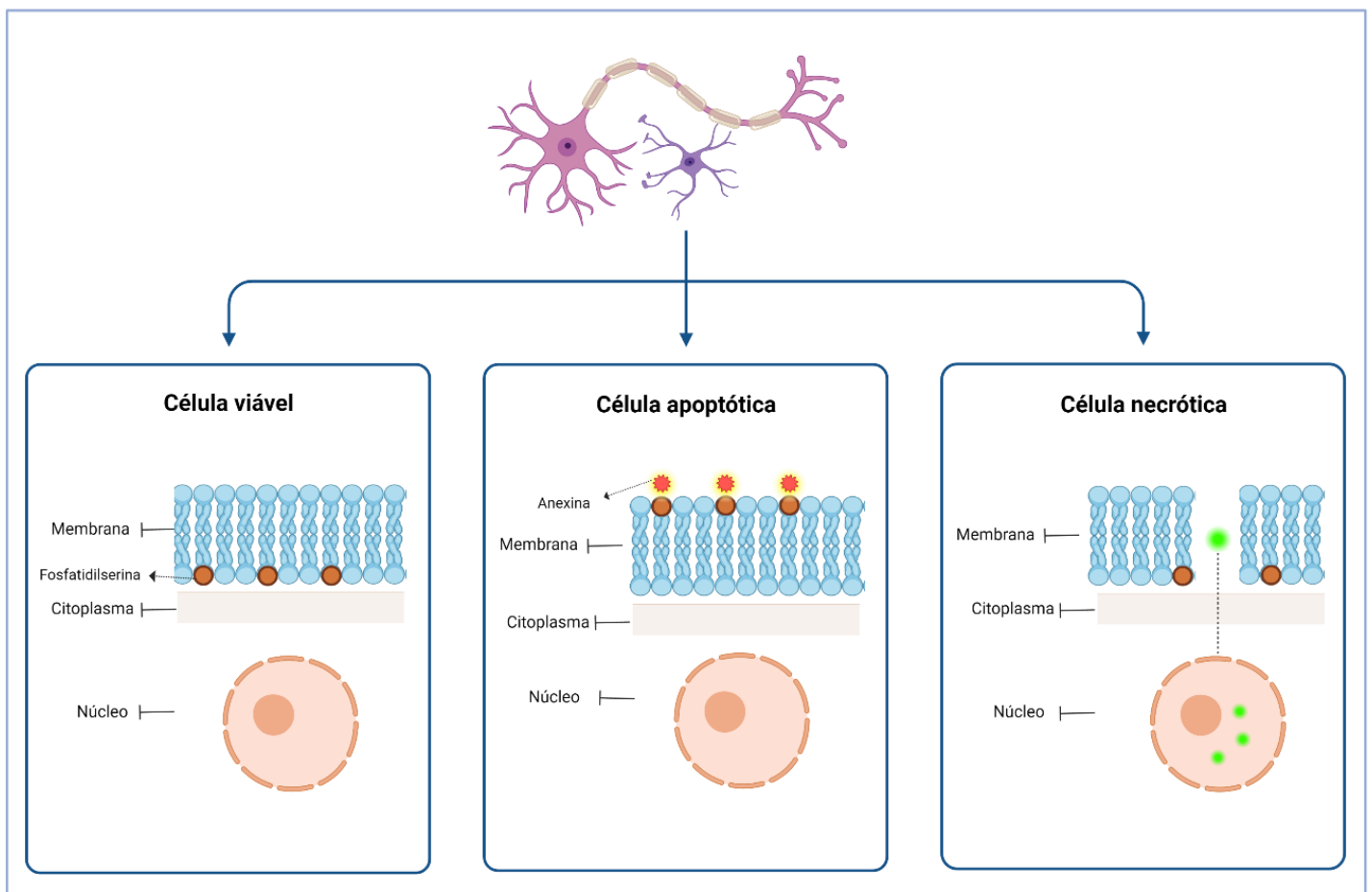
#### 4.5.4 Avaliação da integridade de membrana e exposição da fosfatidilserina

Para avaliar o mecanismo de morte celular foi utilizada a marcação com as substâncias fluorescentes Anexina FITC (Anx/FITC) (conjugada com ficoeritrina) e Iodeto de propídeo (PI). Em um processo apoptótico ocorre a externalização da proteína fosfatidilserina, facilitando a afinidade da Anexina V. Já a marcação com o PI indica que está acontecendo um processo necrótico, visto que a membrana está rompida e o marcador é capaz de ligar-se ao DNA da célula (Figura 13).

Para executar a análise, as células foram suspensas em 100 µL em tampão de ligação e em seguida adicionou-se 5 µL de PI e 5 µL de Ax/PE (0,5mg/mL cada). O procedimento foi realizado utilizando um kit comercial (*Anexin V PE Apoptosis Detection Kit I*, BD Biosciences). Após 15 minutos de incubação em ambiente sem luz, foi adicionado 400 µL de tampão de

ligação em cada tubo e as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD Biosciences). Para análise dos resultados, foram consideradas as células não marcadas como viáveis, células com dupla marcação são consideradas em processo apoptótico tardio, marcadas com Anexina V, indicativo de apoptose e com iodeto de propídeo, necrose (ROCHA et al., 2012)

Figura 13 – Representação do teste para avaliação de morte celular por apoptose precoce, tardia ou necrose.



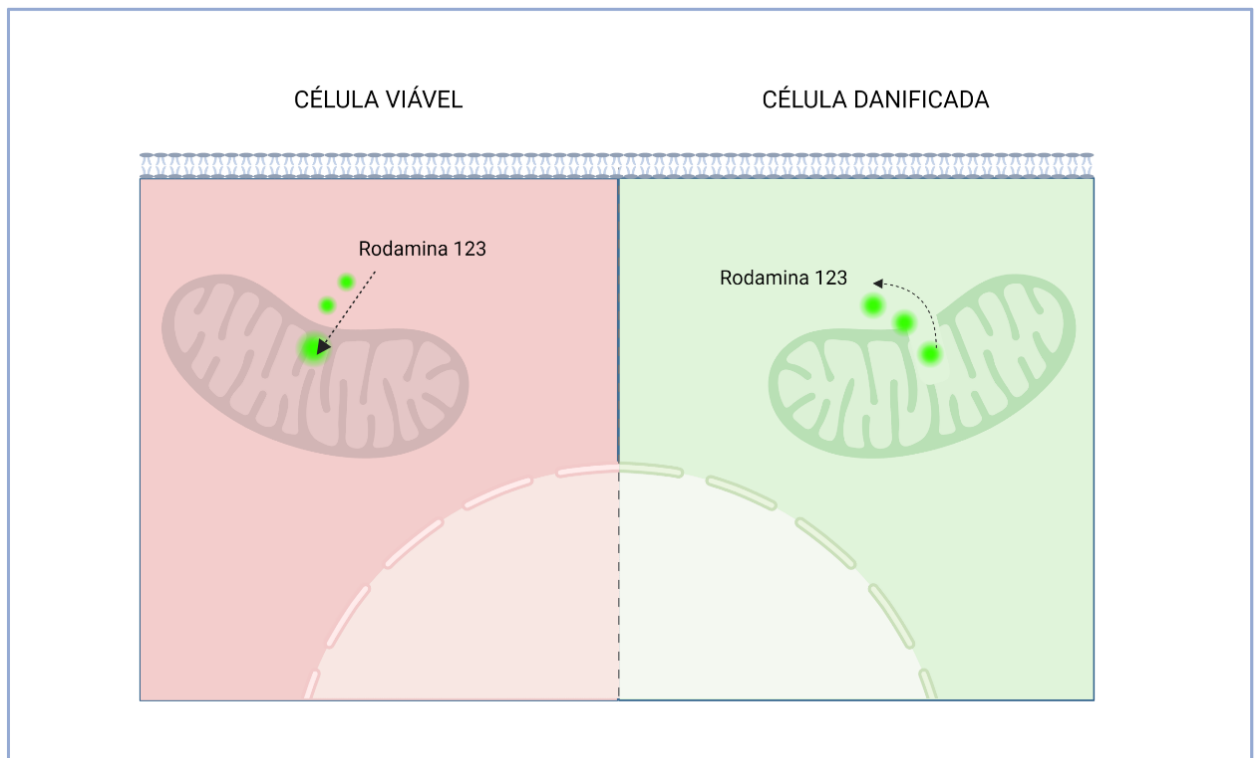
Fonte: Autoria própria.

#### ***4.5.5 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial***

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Ele é capaz de ligar-se à mitocôndria de células vivas. Por ser um corante fluorescente catiônico, torna-se permeável à membrana da célula, incorporando-se no interior da organela, já que possui elevado potencial elétrico negativo, emitindo fluorescência vermelha (Figura 14). Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico induz o efluxo de Rodamina 123, reduzindo a fluorescência. (JOHNSON et al., 1980).

Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectados em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde no citoplasma comparado à fluorescência vermelha mitocondrial, indicando uma difusão da Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas. Sendo assim, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, dificultando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada através do filtro de fluorescência vermelha (FL2).

Figura 14 – Representação do teste para análise do potencial transmembrânico mitocondrial utilizando o corante de Rodamina123.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.5.6 Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) citoplasmáticas

O ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, fornecendo um substrato oxidável (DCFH), como representado na Figura 15. O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que atravessa a membrana plasmática. No citoplasma, enzimas citosólicas, como as esterases, desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), que fica confinada no citoplasma devido a sua polaridade. Espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com excitação em 488 nm e detecção em 515-545 nm pelo sensor FL1.

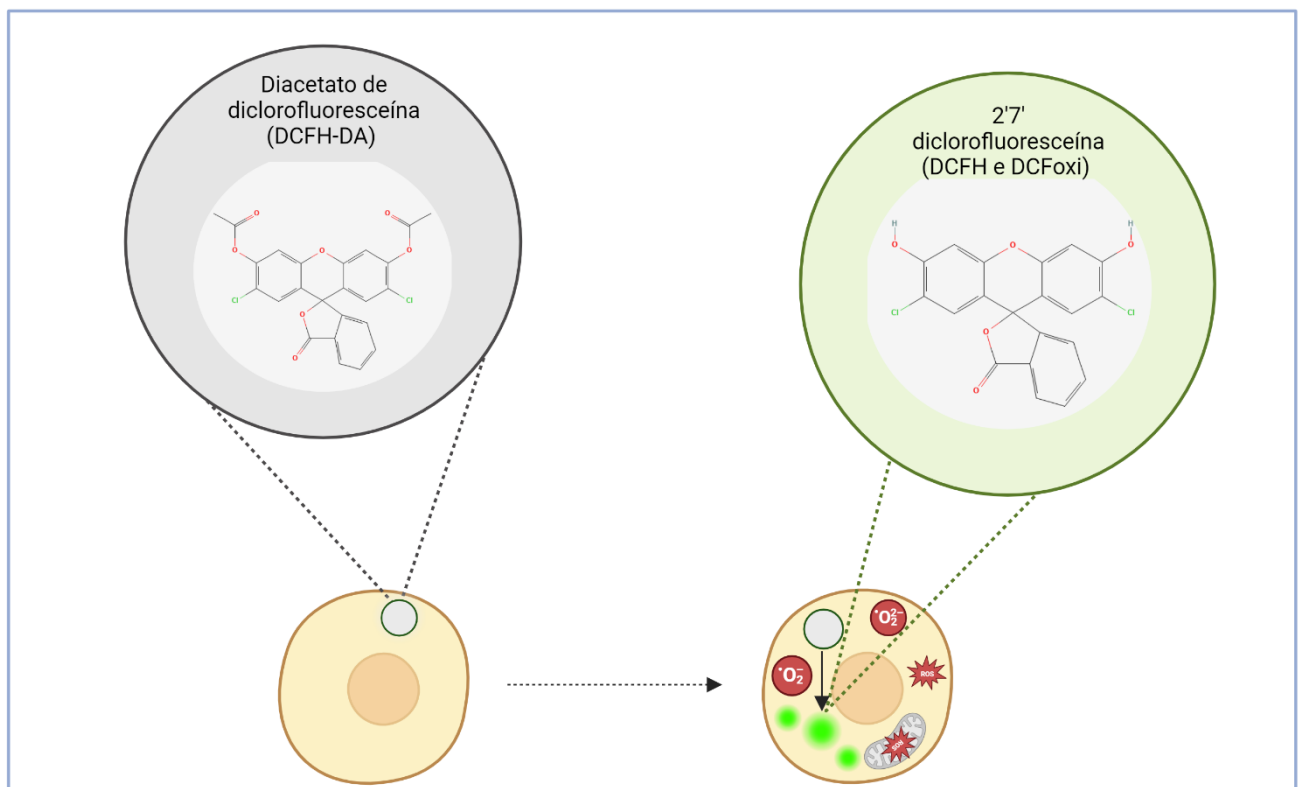
A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma, a intensidade da fluorescência intracelular torna-se uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células (ARANDA et al., 2013).

Para a incorporação do DCFH- no interior das células, 5µL (concentração final 20 µM) da solução estoque foram adicionados aos poços da placa de 24 poços contendo as células em

cultivo 3 horas após o tratamento com  $\alpha$ -bisabolol, como previamente descrito (ARANDA et al., 2013). Ao término das 12 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o *pellet* de células processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde.

Os resultados dos ensaios de DCFH e de Rhodamina123 foram obtidos através da intensidade relativa de fluorescência, no qual determinou-se a partir dos valores absolutos da intensidade de fluorescência, onde foi calculada uma média geométrica, atribuindo valor 1,0 para o grupo controle. As médias dos demais grupos receberam valores proporcionais, conforme descrito por (POKORNÝ et al., 2014).

Figura 15 – Princípio do teste para análise de Espécies Reativas de Oxigênio intracitoplasmáticas utilizando a conversão de DCFH-DA em DCFH e DCFoxi.



Fonte: Autoria própria

#### 4.5.7 Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ no sobrenadante das células

Os níveis de IL1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$  no sobrenadante de células PC12 e Astrócitos foram determinados através de um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) comercial (R & D Systems, Minneapolis, EUA). Inicialmente, os poços das placas foram revestidos com o anticorpo de captura (IL-6 – 2,00  $\mu$ g/mL; IFN- $\gamma$  - 4,00  $\mu$ g/mL) em um volume de 100  $\mu$ L, e a placa foi selada e incubada *overnight* sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (400  $\mu$ L de Tween-20 a 0,05% em PBS).

Após o bloqueio com 300  $\mu$ L de albumina sérica bovina (BSA 1% em PBS) por 2 horas, 100  $\mu$ L dos padrões de IL-1 $\beta$  (250 – 3,9 pg/mL), IFN- $\gamma$  (1000 – 15,63 pg/mL) ou IL-6 (600 – 9,38 pg/mL) recombinantes humanos e sobrenadante de cultivo de células foram adicionados a cada poço e incubadas sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas, sendo a placa novamente lavada. Logo após, 100  $\mu$ L de anticorpo anti-IL1 $\beta$ , anti-IL-6 ou anti-IFN- $\gamma$  foram adicionados a cada poço e a placa incubada durante duas horas, sendo repetida a lavagem.

Por fim, em cada poço foram adicionados 100  $\mu$ L de estreptavidina-HRP e incubados durante 20 minutos. Após realizada a lavagem, 100  $\mu$ L do substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo a reação cessada com 50  $\mu$ L de solução de parada. A absorbância foi medida a 450 nm, com correção de absorbância em 540 nm. As concentrações dos analitos foram calculadas com base nas curvas padrão (pg/mL).

#### 4.5.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de visualizar as alterações ultra estruturais das células causadas pelo LPS, utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Esta técnica gera imagens tridimensionais em alta resolução da superfície de amostras, através da incidência de um feixe de elétrons, a partir de um cátodo, que condensa sobre a amostra. Ao interagir com o material, os elétrons perdem energia por dispersão, no qual são captados por um detector, resultando em uma imagem virtual com o auxílio de um software (CHIHANGA et al., 2018).

Para realizar a MEV, as células PC12 e astrócitos foram cultivadas em lamínulas de vidro circulares estéreis, e em seguida foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em 0,1M (pH 7,2 à temperatura ambiente, durante 2 horas) e desidratadas com diferentes concentrações de etanol, revestidas com uma camada de 20nm de ouro em um Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG-FEI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).



## 4.6 Teste *in silico*

### 4.6.1 *Docking Molecular*

As técnicas de ancoragem molecular (*docking* molecular) fornecem estimativas da energia livre de ligação entre proteínas e ligantes, antes mesmo que esses sejam sintetizados. Esta importante ferramenta tem sido usada com o objetivo de selecionar composto para determinado alvo, e no desenho racional de possíveis candidatos que apresentariam melhor interação com o sítio ativo de um determinado receptor (RODRIGUES et al. 2012).

#### 4.6.1.1 *Procedimento experimental*

O procedimento foi realizado utilizando as ferramentas Avogadro 1.2.0, *Autodock Tools* 1.5.7, e *Autodock 4.1*. As coordenadas para o receptor transmembrana do tipo toll-like 4 (TLR4), para a enzima heme oxigenase (HMOX) e para a enzima fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) foram obtidas do banco de dados Protein Data Bank (respectivamente os códigos de cada macromolécula: 2Z63, 3CZY e 1E7U (WALKER et al., 2000; KIM et al., 2007; JIA e RAHMAN., 2008). As moléculas de água foram removidas e os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura cristalográfica original. As estruturas moleculares do composto  $\alpha$ -bisabolol foram desenhadas utilizando-se o *software* Avogadro e ajustados suas cargas de Gasteiger com a ferramenta *AutoDock Tools*. Os arquivos do receptor e ligante foram preparados de acordo com os protocolos originais (MORRIS et al., 2009).

O *docking* foi realizado utilizando-se as instruções do Algoritmo Genético Lamarckiano (*Lamarckian Genetic Algorithm*). Foram usados parâmetros padrões de busca, exceto pela quantidade de energias calculadas (250.000) e corridas de *docking* (100). Finalmente, a área central de cada macromolécula foi escolhida para realização das corridas do *docking* agrupando-se as orientações com distância 0,886 Å para se obter o modo de *docking* mais favorável. Após a realização da primeira simulação, foram selecionados 2 pontos diferentes da macromolécula para realização de *docking* mais específico. Dessa forma, foram utilizados parâmetros atualizados de busca para energias calculadas (25.000.000), corridas de *docking* (100) e distância (0,375 Å). A estrutura da proteína foi considerada rígida em todas as corridas.

#### 4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software®, San Diego Califórnia EUA). Inicialmente, os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra. Em seguida, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (*post hoc*) para resultados paramétricos, ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (*post hoc*) para os não paramétricos. Em todas as análises estatísticas, os valores foram representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) ou mediana (25percentil-75percentil), para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente, com valores significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Testes *in vivo*

#### 5.1.1 Testes comportamentais

##### 5.1.1.1 Teste do campo aberto

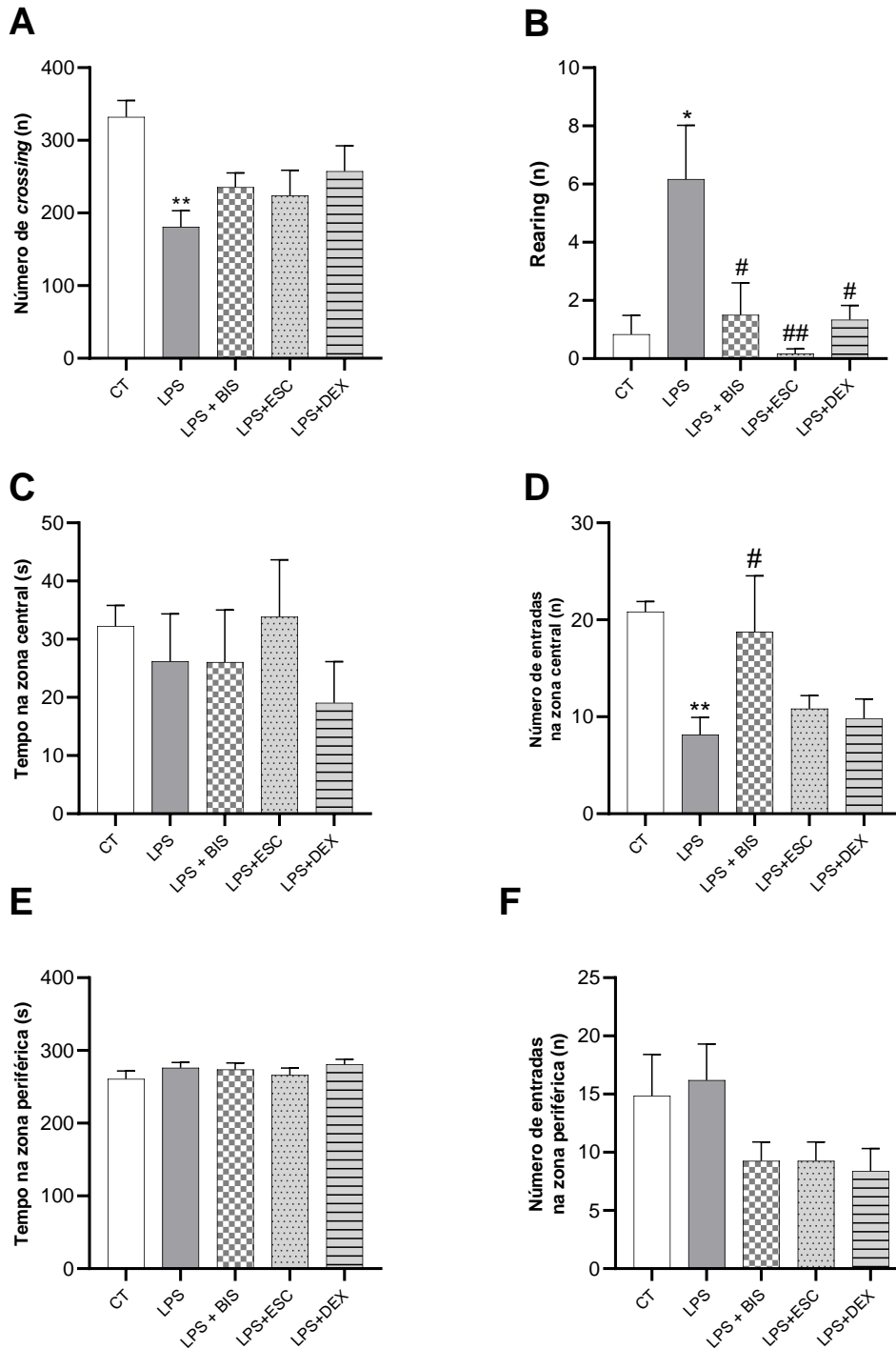
No teste do campo aberto, cujo objetivo é verificar o comportamento de locomoção e exploração do animal em um ambiente novo, verificou-se os seguintes parâmetros: número de *crossing*, *rearing*, tempo e número de entradas na zona central e periférica (Figura 16)

No número de *crossing* verificou-se que o grupo tratado com LPS reduziu quando comparado ao grupo controle. Os animais tratados não obtiveram diferença em relação ao grupo LPS (Figura 16A) (CT:  $332 \pm 22,97$ ; LPS:  $180,7 \pm 22,65$ ). No número de levantamentos verticais ou *rearing*, percebeu-se que o LPS foi capaz de aumentar esse comportamento, enquanto ao tratar com  $\alpha$ -bisabolol e as substâncias de referência, houve reversão, verificando uma redução no parâmetro (Figura 16B) (CT:  $0,83 \pm 0,65$ ; LPS:  $6,16 \pm 1,85$ ; LPS+BIS:  $1,5 \pm 1,10$ ; LPS+ESC:  $0,16 \pm 0,16$ ; LPS+DEX:  $1,33 \pm 0,49$ ).

No tempo na zona central (Figura 16C) não houve diferença entre os grupos, enquanto no número de entradas (Figura 16D) percebeu-se uma redução no grupo tratado com LPS, quando comparado ao grupo controle, e esse parâmetro foi revertido significativamente pelo tratamento com o BIS (CT:  $20,83 \pm 1$ ; LPS:  $8,16 \pm 1,77$ ; LPS+BIS:  $18,75 \pm 5,77$ ). Verificou-se que nos parâmetros relacionados ao tempo e o número de entradas na zona periférica (Figura 16C e 16D, respectivamente), não houve alteração entre os grupos.

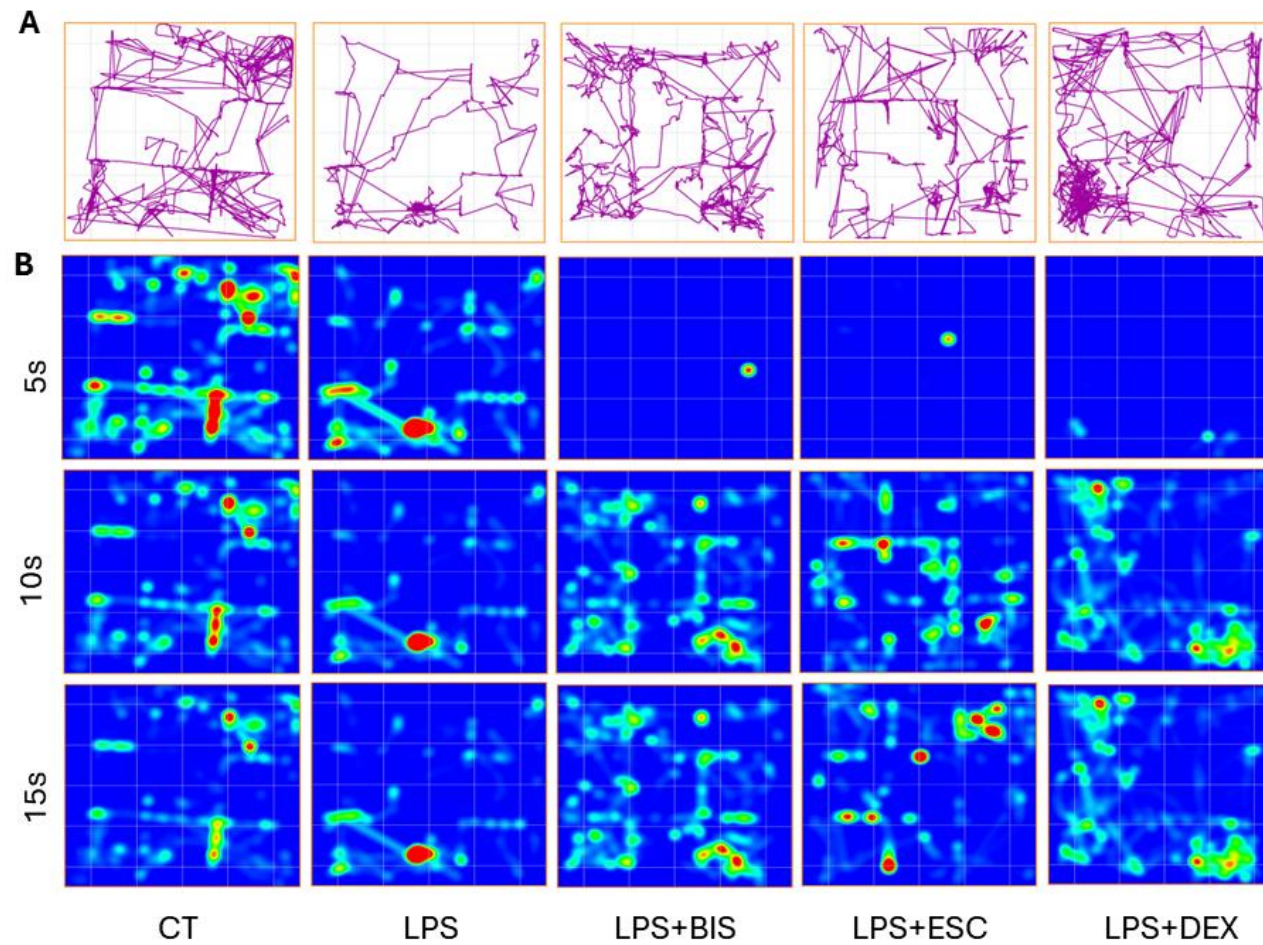
Os critérios supracitados podem ser demonstrados na Figura 17A e 17B, no qual representa o trajeto percorrido e o mapa de calor, respectivamente, com o intuito de rastrear a locomoção dos animais.

Figura 16 – Parâmetros avaliados no teste do campo aberto. Número de cruzamentos ou *crossings* (A), número de levantamentos verticais ou *rearing* (B) Tempo (C) e número de entradas (D) na zona central, e Tempo (E) e número de entradas (F) na zona periférica.



Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com (-)α-bisabolol (50mg/kg), Escitalopram (10mg/kg) ou Dexametasona (2mg/kg). Os valores estão representados como média ± EPM. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs CT; #p<0,05, ##p<0,01 vs LPS. Teste de One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-)α-bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona.

Figura 17 – Trajeto do animal durante o teste (A) e mapa de calor (B) nos tempos de 5, 10 e 15 segundos.

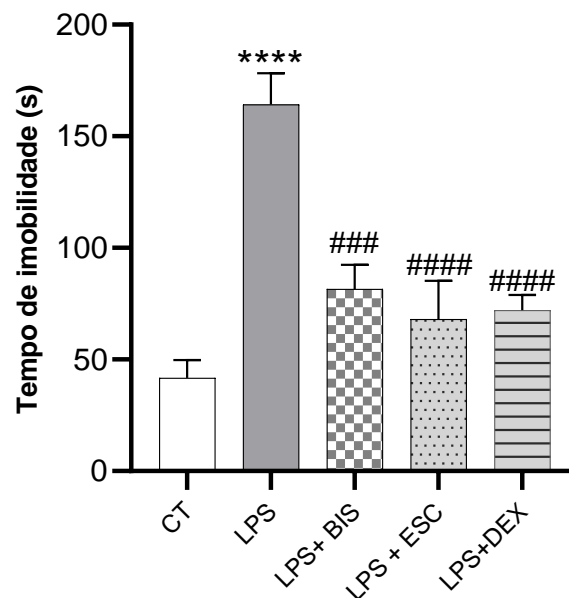


Fonte: Gráficos extraídos do *Software AnyMaze*

### 5.1.1.2 Teste do nado forçado

No teste para avaliar o tempo de imobilidade, que avalia o comportamento depressivo-símile, foi verificado que os animais submetidos à exposição com o LPS apresentaram aumento em comparação ao grupo controle (CT:  $41,71 \pm 7,96$ ; LPS:  $164,3 \pm 14,01$ ). Tal resultado foi revertido com o tratamento com o BIS, com o Escitalopram e com o Dexametasona como demonstra na Figura 18 (LPS+BIS:  $81,57 \pm 10,81$ ; LPS+ESC:  $68 \pm 17,28$ ; LPS+DEX:  $72,14 \pm 6,79$ ) (média em segundos).

Figura 18 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.

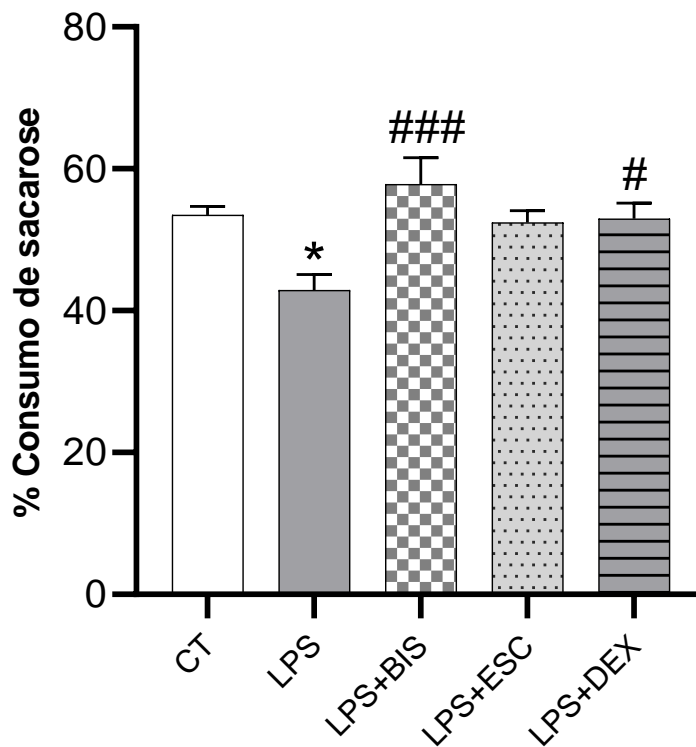


Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com (-) $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg), Escitalopram (10mg/kg) ou Dexametasona (2mg/kg). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*\*p<0,0001 vs CT; ###p<0,001, ####p<0,0001 vs LPS. Teste de One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-) $\alpha$ -bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona.

### 5.1.1.3 Teste da preferência pela solução de sacarose

No teste de preferência pela solução de sacarose, que verifica o comportamento de anedonia nos animais, foi visto que o grupo exposto ao LPS apresentou redução no consumo. Todavia, o tratamento com o BIS e com o DEX ocasionou reversão nesse comportamento, aumentando assim o consumo da solução de sacarose, representando redução da anedonia nos animais (CT:  $53,53 \pm 1,19$ ; LPS:  $42,90 \pm 2,22$ ; LPS+BIS:  $57,86 \pm 3,74$ ; LPS+DEX:  $52,94 \pm 2,22$ ) (média em %) (Figura 19).

Figura 19 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol no teste da preferência pela solução de sacarose em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.

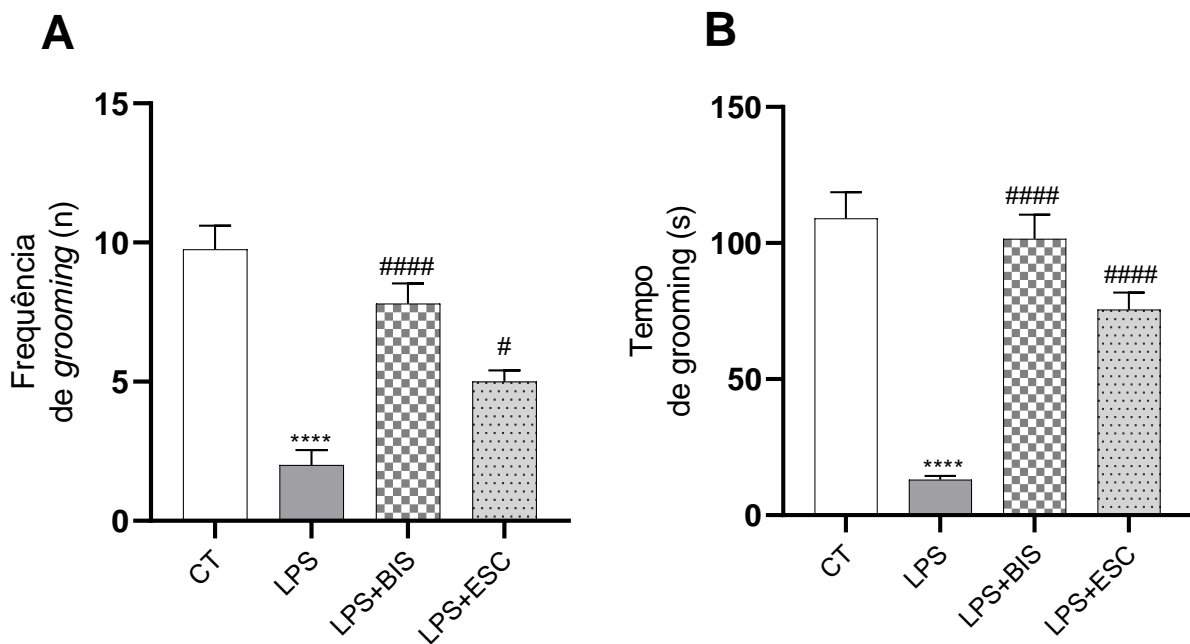


Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com (-) $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg), Escitalopram (10mg/kg) ou Dexametasona (2mg/kg). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. \*p<0,05 vs CT; #p<0,01, ###p<0,001 vs LPS. Teste de *One-way* ANOVA, seguido de *Tukey (post hoc)*. CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-) $\alpha$ -bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona.

#### 5.1.1.4 Teste do “Splash”

O teste do *Splash* ou do respingo verifica o comportamento de autolimpeza ou *grooming* do animal quando este recebe resquírios de solução de sacarose na pelagem. Verifica-se que o grupo que recebeu LPS apresentou redução tanto na frequência (CT:9,75±0,85; LPS: 2±0,54), quanto no tempo (CT:109±9,6; LPS:13±1,3) de *grooming*, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com o BIS e com o antidepressivo ESC reverteu tanto a quantidade de *groomings* (LPS+BIS:7,8±0,73; LPS+ESC:5±0,4) quanto o tempo (LPS+BIS: 101,6±8,8; LPS+ESC: 75,60±6,2) quando comparado ao grupo LPS (média de frequência em número absoluto e média de tempo em segundos) (Figura 20).

Figura 20 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol no teste de *splash* em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.



Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com  $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg), Escitalopram (10mg/kg) ou Dexametasona (2mg/kg). Os valores estão representados como média ± EPM. \*\*\*\*p<0,0001 vs CT; #p<0,01, ####p<0,0001 vs LPS. Teste de *One-way ANOVA*, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-) $\alpha$ -bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona.

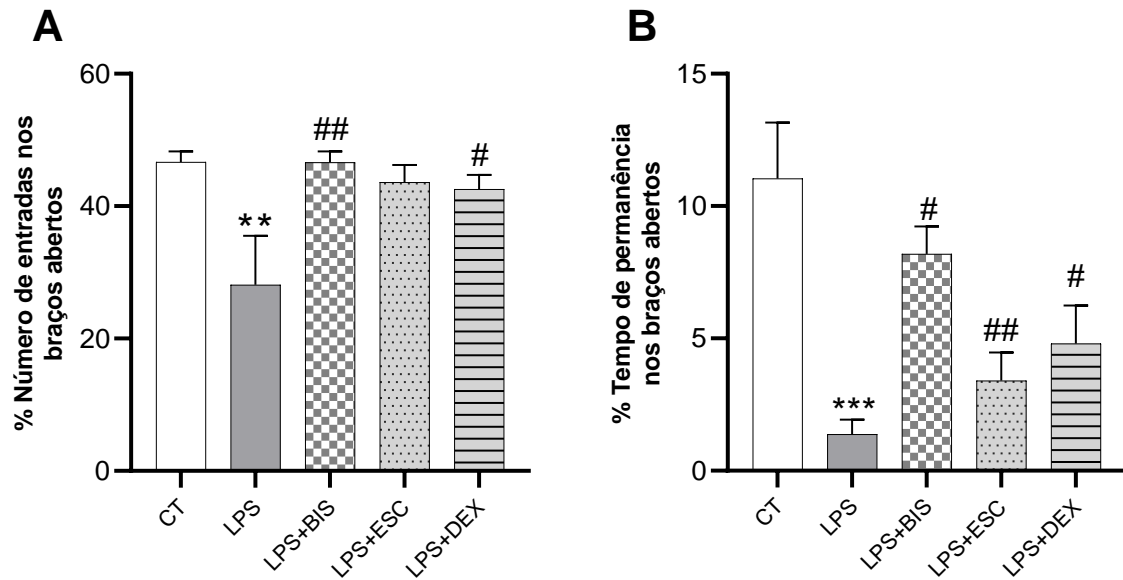


#### 5.1.1.5 Teste do labirinto em cruz elevada

No teste para avaliar o comportamento ansioso-símile dos animais, no primeiro parâmetro avaliado: percentual do número de entradas nos braços abertos, verificou-se que os animais expostos ao desafio com o LPS, apresentou redução, ou seja, os animais deram preferência a entrar nos braços fechados. O tratamento com o BIS foi capaz de reverter esse comportamento, visto que houve aumento em comparação ao grupo LPS. O mesmo comportamento foi verificado pelo grupo tratado com Dexametasona, entretanto o tratamento com Escitalopram não causou reversão (CT:  $46,69 \pm 1,58$ ; LPS:  $28,14 \pm 7,40$ ; LPS+BIS:  $46,63 \pm 1,66$ ; LPS+ESC:  $43,62 \pm 2,61$ ; LPS+DEX:  $42,56 \pm 2,16$ );(média em %).

O outro parâmetro considerado foi o percentual do tempo de permanência dos animais nos braços abertos. Neste, verificou-se que os animais expostos ao LPS permaneceram maior tempo nos braços fechados, reduzindo então o tempo nos braços abertos em comparação ao controle (CT:  $11,04 \pm 2,11$ ; LPS:  $1,38 \pm 0,55$ ). Ao submeter os animais ao tratamento com o BIS e com os fármacos de controle antidepressivo e anti-inflamatório, houve reversão do comportamento (LPS+BIS:  $8,19 \pm 1,0$ ; LPS+ESC:  $3,4 \pm 1,0$ ; LPS+DEX:  $4,8 \pm 1,44$ ) (Figura 21).

Figura 21 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol sobre o percentual do número de entradas (A) e do tempo de permanência (B) nos braços abertos, no teste do labirinto em cruz elevada, em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.

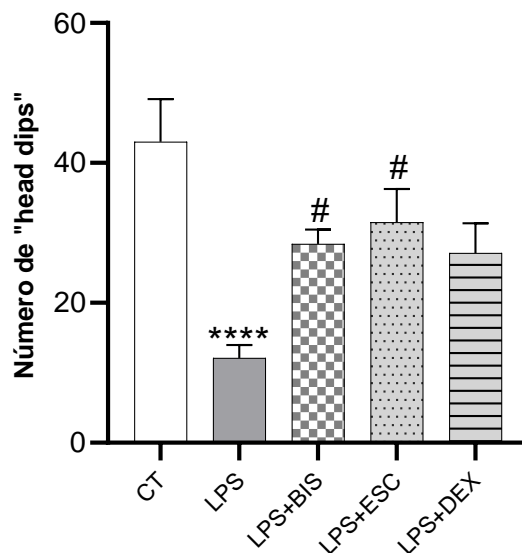


Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com (-) $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg), Escitalopram (10mg/kg) ou Dexametasona (2mg/kg). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs CT; #p<0,01, ##p<0,01 vs LPS. Teste de *One-way* ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-) $\alpha$ -bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona

### 5.1.1.6 Teste da placa perfurada

No teste da placa perfurada, no qual avalia comportamento do tipo ansioso é mensurado pelo número de “mergulhos”, também chamados de *head dips*, que o animal faz dentro de um determinado tempo. Verificou-se que os animais expostos ao LPS apresentaram redução no parâmetro ao comparar-se com o controle (CT:43±6,11; LPS: 12,11±1,88). O mesmo foi revertido ao serem tratados tanto com o BIS como com ESC e DEX (LPS+BIS: 28,44±2,02; LPS+ESC: 31,50±4,77; LPS+DEX:27,13±4,23)(média em número absoluto)(Figura 22).

Figura 22 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol sobre o número de “mergulhos” (*head dips*), no teste da placa perfurada em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.



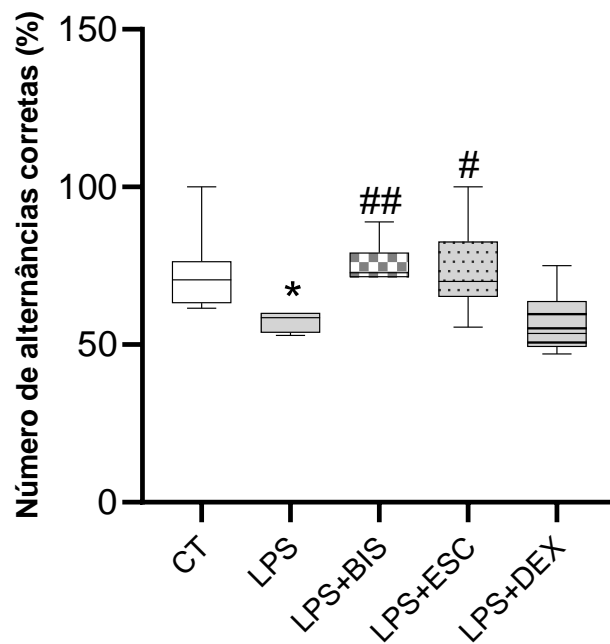
Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com (-) $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg), Escitalopram (10mg/kg) ou Dexametasona (2mg/kg). Os valores estão representados como média ± EPM. \*\*\*\*p<0,0001 vs CT; #p<0,01 vs LPS. Teste de *One-way* ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-) $\alpha$ -bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona.

### 5.1.1.7 Teste do labirinto em Y

O grupo LPS apresentou redução no número de alternâncias corretas quando comparado ao grupo controle (CT:70,59 (63,16-76,47) LPS:58,57(53,77-60)). Tal parâmetro foi revertido

após o tratamento com o  $\alpha$ -bisabolol e com o fármaco de referência Escitalopram (LPS+BIS:72,78(71,43-79,23); LPS+ESC: 70(65,15-82,64)), como está representado na Figura 23.

Figura 23 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol sobre o número de alternâncias corretas, em percentual (%), no teste do labirinto em Y (*plus maze*), em animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.



Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com  $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg), Escitalopram (10mg/kg) ou dexametasona (2mg/kg). Os valores estão representados como mediana (Percentil25-percentil 75) . \*p<0,05 vs CT; #p<0,05 vs LPS. Teste de Kruskal Wallis, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-) $\alpha$ -bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona

## 5.1.2 Testes neuroquímicos

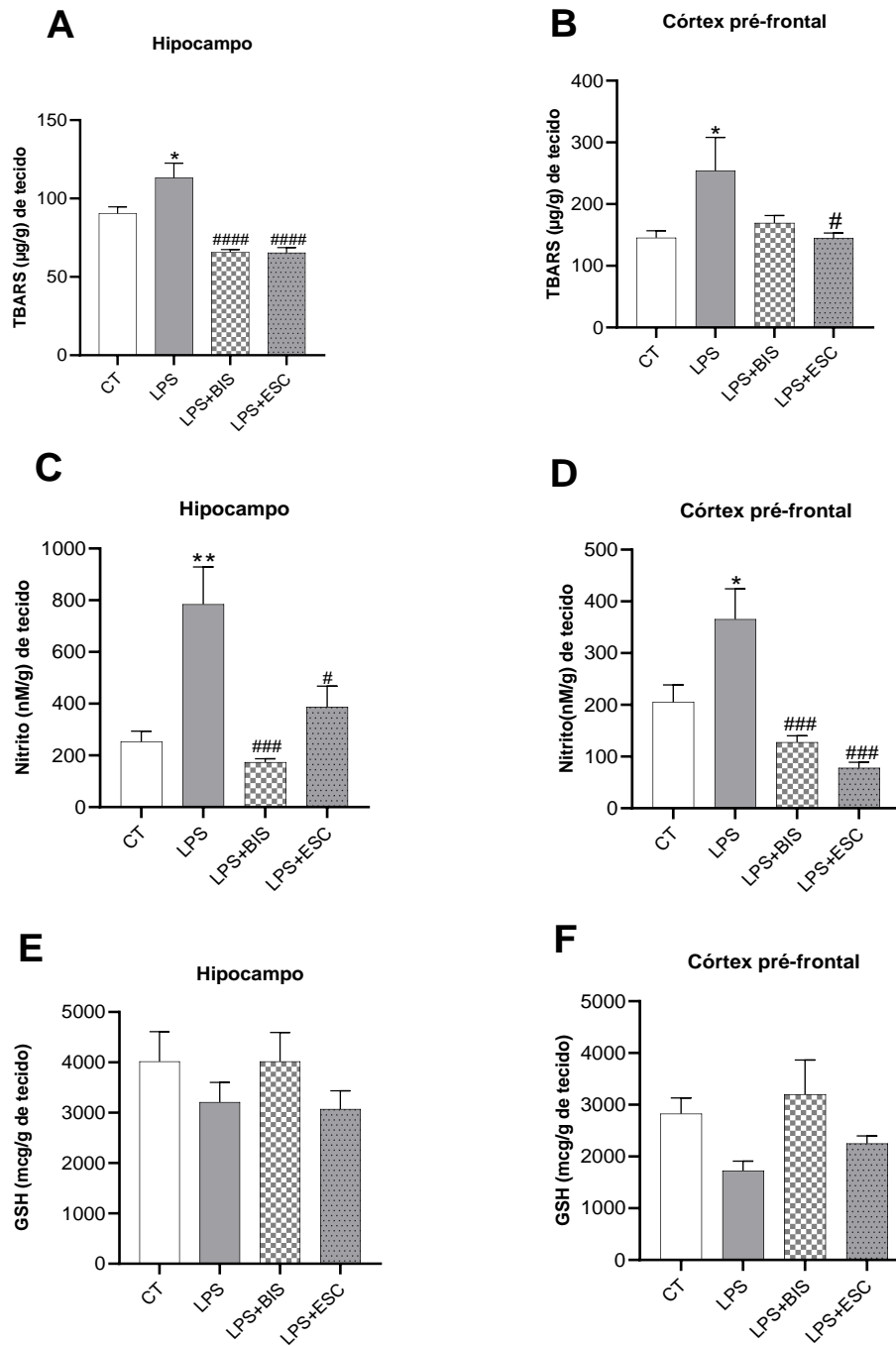
### 5.1.2.1 Determinação de parâmetros oxidativos

A avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de nitrito e de glutathiona reduzida (GSH), foi realizada nas áreas do hipocampo e do córtex pré-frontal (Figura 24). Na dosagem de TBARS, verificou-se um aumento no grupo tratado com o LPS em comparação ao controle, em ambas as áreas (HP: CT:90,40±4,2; LPS: 113,2±9,31; CPF: CT: 145,6±11,28; LPS: 254,3±53,79) (Figura 24A e 24B). O BIS foi capaz de reduzir os níveis de TBARS no Hipocampo (Figura 24A), e o fármaco antidepressivo Escitalopram reduziu em ambas as áreas cerebrais, em comparação ao LPS (Hipocampo: LPS+BIS: 65,87±1,6; LPS+ESC: 65,46±3,2; CPF: LPS+ESC: 145,3±7,97).

Na avaliação de nitrito foi visto que houve um aumento dos níveis no grupo tratado com o LPS, em comparação ao controle, e uma redução ao tratar com  $\alpha$ -bisabolol e Escitalopram, em ambas as áreas (Figura 24C e 24D)(HP: CT: 252,6±40,75; LPS: 784,4±144,6; LPS+BIS: 173,8±13,13; LPS+ESC: 387,8±79,84; CPF: CT: 205,1±33,44; LPS: 365,6±58,63; LPS+BIS: 127,9±12,31; LPS+ESC:78,18±10,85).

Os níveis de GSH não apresentaram diferença entre os grupos, em ambas as áreas cerebrais (Figura 24E e 24F).

Figura 24 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol nos parâmetros de estresse oxidativo através da mensuração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)(A e B), nitrito (C e D) e glutathiona reduzida (GSH)(E e F), em hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente, de animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.



Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com (-)α-bisabolol (50mg/kg) ou Escitalopram (10mg/kg). No 11º dia foram eutanasiados e as áreas do hipocampo e córtex pré-frontal dissecadas. Os valores estão representados como média ± EPM. \*p<0,05 \*\*p<0,01 vs CT; #p<0,05 ###p<0,001####p<0,0001 vs LPS. Teste de *One-way* ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS: (-)α-bisabolol, ESC: Escitalopram.

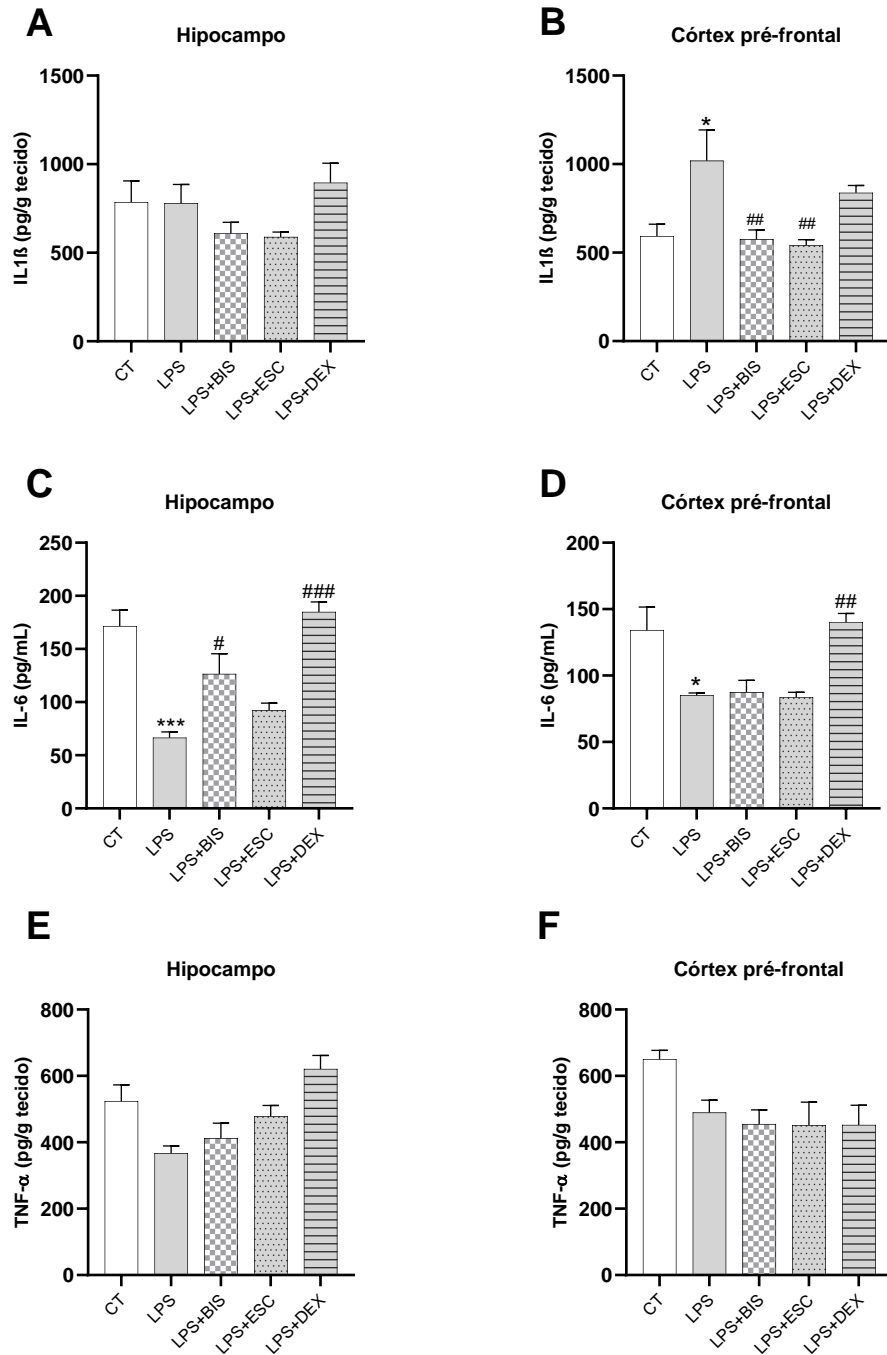
### 5.1.2.2 Mensuração de citocinas

A administração com o LPS foi capaz de aumentar os níveis de interleucina  $1\beta$  no córtex pré-frontal (Figura 25B), e ao tratar com o BIS e com o ESC, houve uma redução nos níveis da citocina ao comparar com o grupo controle. Entretanto, não foi vista alteração no hipocampo (Figura 25A). (CPF: CT:  $593,6\pm 67,31$ ; LPS:  $1019\pm 174,4$ ; LPS+BIS:  $575,1\pm 53,32$ ; LPS+ESC:  $540,9\pm 32,21$ ).

Ao mensurar os níveis de interleucina-6, verificou-se que o grupo LPS reduziu, em comparação ao grupo controle, em ambas as áreas cerebrais. O tratamento com o BIS foi capaz de reverter esses níveis no hipocampo (Figura 25C), assim como o grupo tratado com o Dexametasona. No córtex pré-frontal, o DEX também foi capaz de reverter. (Figura 25D) (HP: CT:  $171,5\pm 15,07$ ; LPS:  $66,46\pm 5,44$ ; LPS+BIS:  $125,6\pm 18,95$ ; LPS+DEX:  $184,8\pm 9,50$ ; CPF: CT:  $134,1\pm 17,42$ ; LPS:  $85,13\pm 1,78$ ; LPS+DEX:  $140,1\pm 6,73$ ).

Os níveis do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) permaneceu inalterado em ambas as áreas cerebrais (Figura 25E e 25F).

Figura 25 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol nos níveis de citocinas Interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ )(A e B), Interleucina-6 (IL-6)(C e D) e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )(E e F) em hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente, de animais submetidos ao modelo de exposição ao LPS.



Os animais (n=8-10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6<sup>o</sup> dia foram tratados com  $\alpha$ -bisabolol (50mg/kg) ou Escitalopram (10mg/kg). No 11<sup>o</sup> dia foram eutanasiados e as áreas do hipocampo e córtex pré-frontal dissecadas. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 vs CT; #p<0,05 ##p<0,01 ###p<0,001 vs LPS. Teste de *One-way* ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS:  $\alpha$ -bisabolol, ESC: Escitalopram, DEX: Dexametasona.



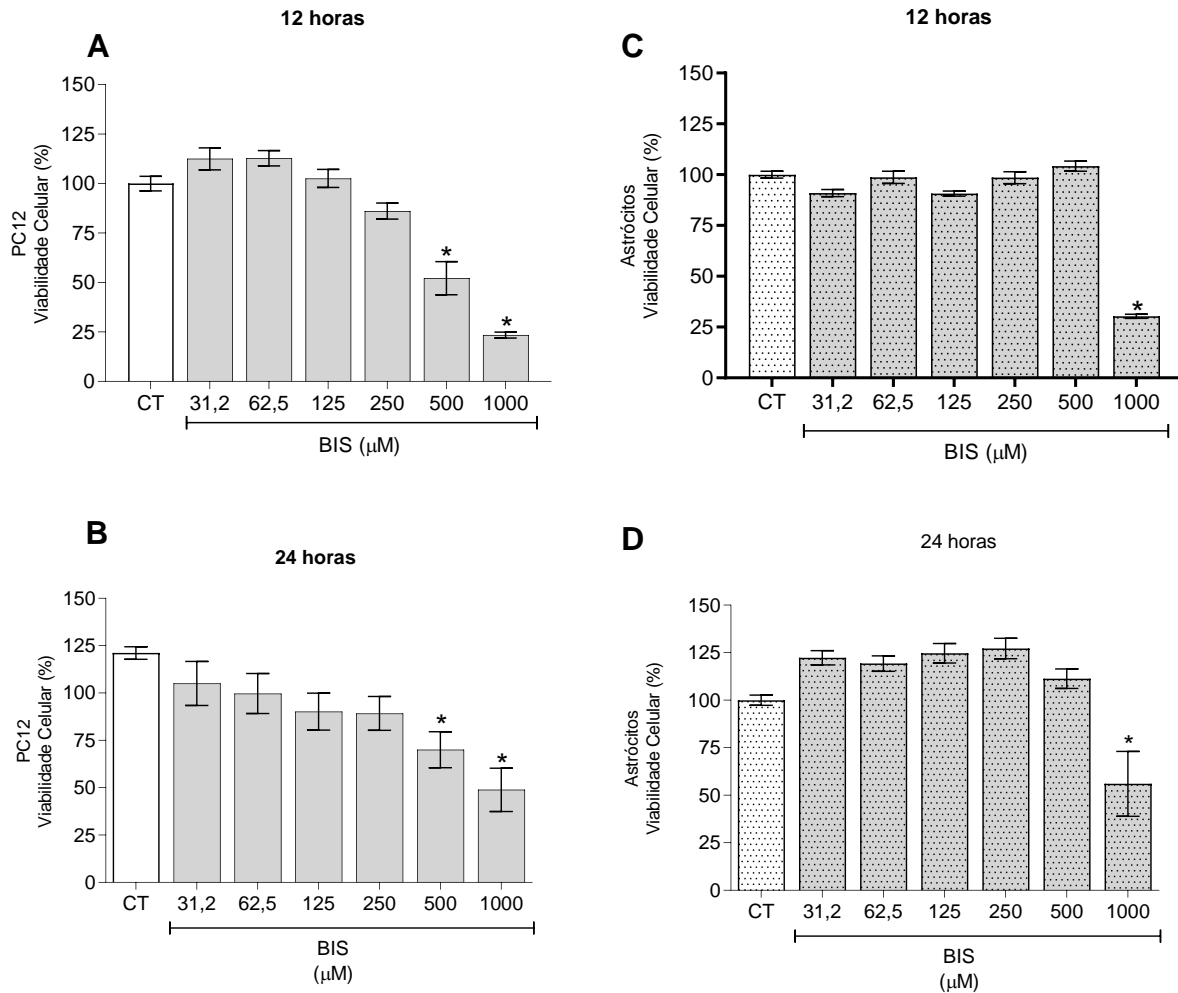
## 5.2 Testes *In vitro*

### 5.2.1 *Ensaio de viabilidade celular*

A concentração adequada de  $\alpha$ -bisabolol para seguimento dos ensaios, deu-se a partir da avaliação da toxicidade de seis concentrações em PC12 e astrócitos nos tempos de 12 e 24 horas. Na linhagem de PC12 as concentrações de 500 $\mu$ M e 1000 $\mu$ M reduziram a viabilidade celular nos dois momentos (12h: CT:100 $\pm$ 3,7; 500 $\mu$ M:52,17 $\pm$ 8,3; 1000 $\mu$ M: 23,4 $\pm$ 1,5; e 24h: CT:121,1 $\pm$ 3,2; 500 $\mu$ M:70,03 $\pm$ 9,5; 1000 $\mu$ M:48,9 $\pm$ 11,4), enquanto em astrócitos, apenas a concentração de 1000  $\mu$ M reduziu (12h: CT:100 $\pm$ 1,7; 1000 $\mu$ M:30,3 $\pm$ 0,9 e 24h: CT:100 $\pm$ 2,6; 1000 $\mu$ M: 56 $\pm$ 17).

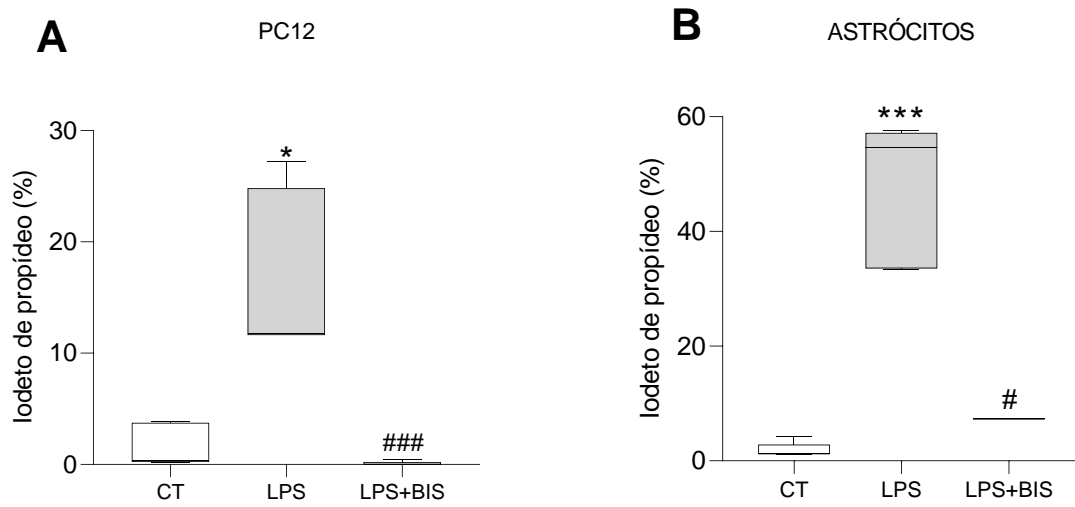
Dessa forma, foi dado a continuidade com a concentração de 250 $\mu$ M para PC12 (12h: 250 $\mu$ M:86 $\pm$ 4 e 24h:250 $\mu$ M:89,2  $\pm$ 8,9) e 500 $\mu$ M para astrócitos (12h: 500 $\mu$ M:104,2 $\pm$ 2,4 e 24h: 500 $\mu$ M: 111,3 $\pm$ 5,1). pois foram as concentrações mais altas testadas que não alteraram a viabilidade celular, quando comparado estatisticamente ao controle e as demais concentrações (Figura 26). Em seguida, a marcação com o iodeto de propídeo (Figura 27A e 27B), demonstrou que houve marcação nas células tratadas com o LPS em ambas as linhagens celulares, verificando dano celular, o que foi controlado pela presença do BIS (PC12: CT 0,33 (0,24-3,7); LPS:11,75 (11,64-24,80); LPS+BIS: 0 (0-0,2; AST: CT: 1,2 (1,1-2,8); LPS: 54,57 (33,57-57,19); LPS+BIS (7,3 (7,3-7,3)).

Figura 26 – Avaliação da toxicidade do  $\alpha$ -bisabolol em células PC12 e Astrócitos. Avaliação de diferentes concentrações de  $\alpha$ -bisabolol em PC12 após 12 horas de incubação (A) e após 24 horas de incubação (B). Avaliação de diferentes concentrações de  $\alpha$ -bisabolol em Astrócitos, após a incubação de 12 horas (C) e após 24h (D).



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle negativo; BIS:  $\alpha$ -bisabolol. \* $p < 0,05$ .

Figura 27 – Avaliação da viabilidade celular submetida ao tratamento com LPS e de LPS seguida de  $\alpha$ -bisabolol em células PC12 (A) e Astrócitos (B).



Os valores estão representados como mediana (Percentil25-percentil 75) . \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  vs CT; # $p < 0,05$  ### $p < 0,001$  vs LPS. Teste de Kruskal Wallis, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BIS:  $\alpha$ -bisabolol.

### 5.2.2 Avaliação do mecanismo de morte celular

Para avaliar o mecanismo de viabilidade celular, ou seja, a ocorrência do processo de morte celular, verificou-se quatro eventos dentro da população de células: células não marcadas, que não apresentaram dano, células marcadas apenas com anexina ( $Pi^-Anx^+$ ), demonstrando apoptose, células marcadas apenas com iodeto de propídeo ( $Pi^+Anx^-$ ), representando necrose, e células com dupla marcação ( $Pi^+Anx^+$ ), indicando apoptose tardia.

Os resultados na linhagem PC12 indicaram que, nas células não marcadas, o grupo tratado com LPS obteve um menor percentual de células, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o grupo tratado com o  $\alpha$ -bisabolol aumentou o quantitativo de células, representando redução de danos nessas células (CT:  $97,67 \pm 0,6$ ; LPS:  $85,69 \pm 2,8$ ; LPS+BIS:  $99,89 \pm 0,05(\%)$ )(Figura 28A).

Verificou-se que no processo de apoptose ( $Pi^-Anx^+$ ), houve um aumento no percentual das células submetidas ao LPS, e a redução desse dano foi visualizado após o tratamento com o BIS (CT:  $0,08 \pm 0,01$ ; LPS:  $30,27 \pm 18,98$ ; LPS+BIS:  $0,09 \pm 0,04(\%)$ ). Não foi verificado apoptose tardia nesta linhagem, ou seja, não foi verificado a presença de células duplamente marcadas com Pi e Anx (Figura 28A).

Para o indicativo de necrose, ou seja, a marcação positiva apenas em iodeto de propídeo ( $Pi^+Anx^-$ ), o grupo do LPS foi o único que apresentou esse dano celular, pois não houve a presença de células marcadas com PI tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado com o BIS (CT:  $0 \pm 0$ ; LPS:  $0,24 \pm 0,14$ ; LPS+BIS:  $0 \pm 0(\%)$ ).

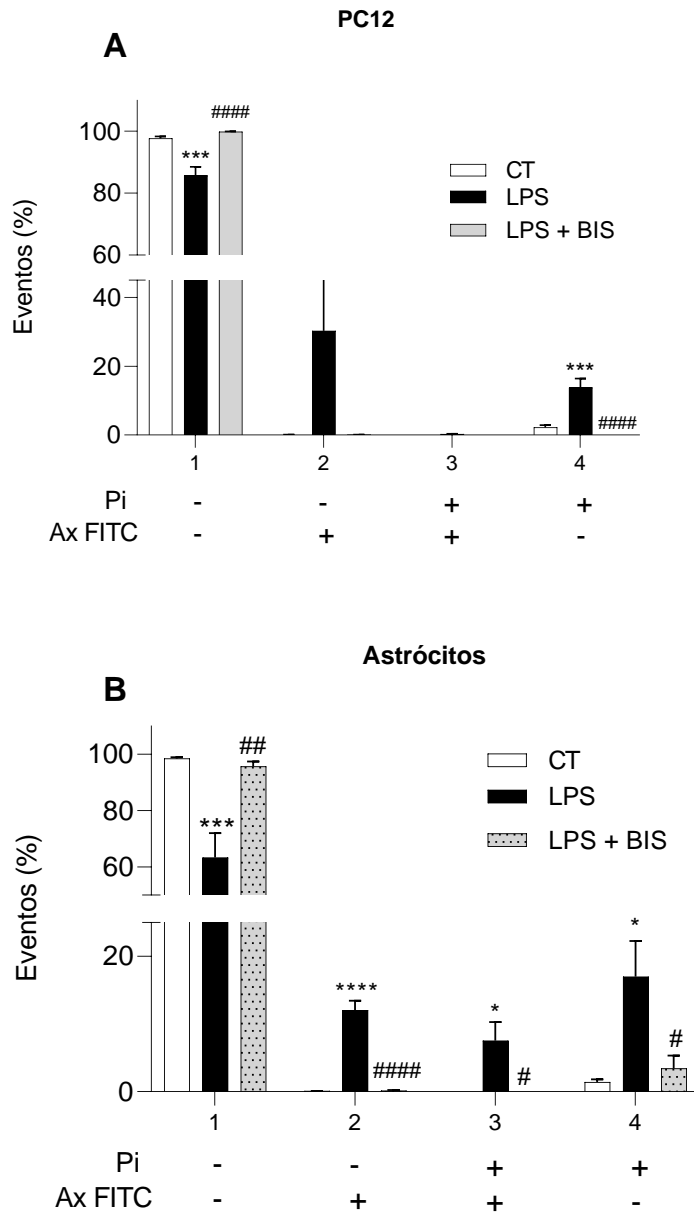
Na linhagem de astrócitos verificou-se que nas células não marcadas, o grupo tratado com LPS reduziu o percentual de viabilidade celular, enquanto o tratamento com o BIS reduziu esse dano, demonstrando aumento no percentual celular (CT:  $98,50 \pm 0,45$ ; LPS:  $63,35 \pm 8,6$ ; LPS+BIS:  $95,63 \pm 1,77(\%)$ ). (Figura 28B).

Ao avaliar o processo de apoptose ( $Pi^-Anx^+$ ), verificou-se marcação com anexina nas células tratadas com LPS (CT:  $0,09 \pm 0,01$ ; LPS:  $12,06 \pm 1,3$ ; LPS+BIS:  $0,15 \pm 0,07(\%)$ ), e o mesmo foi verificado na dupla marcação ( $Pi^+Anx^+$ ), representando apoptose tardia nesse grupo de células (CT:  $0 \pm 0$ ; LPS:  $7,56 \pm 2,7$ ; LPS+BIS:  $0,02 \pm 0,01(\%)$ ). Já o tratamento com BIS reduziu significativamente esses danos, representando que houve uma proteção contra a morte celular (Figura 28B).

Diferente do que foi verificado em PC12, na linhagem de astrócitos houve indicativo de morte celular por necrose nas células que foram submetidas ao LPS. Entretanto, o tratamento com o BIS foi capaz de proteger e reduzir os danos (CT:  $1,4 \pm 0,4$  LPS:  $17,02 \pm 5,26$ ; LPS+BIS:

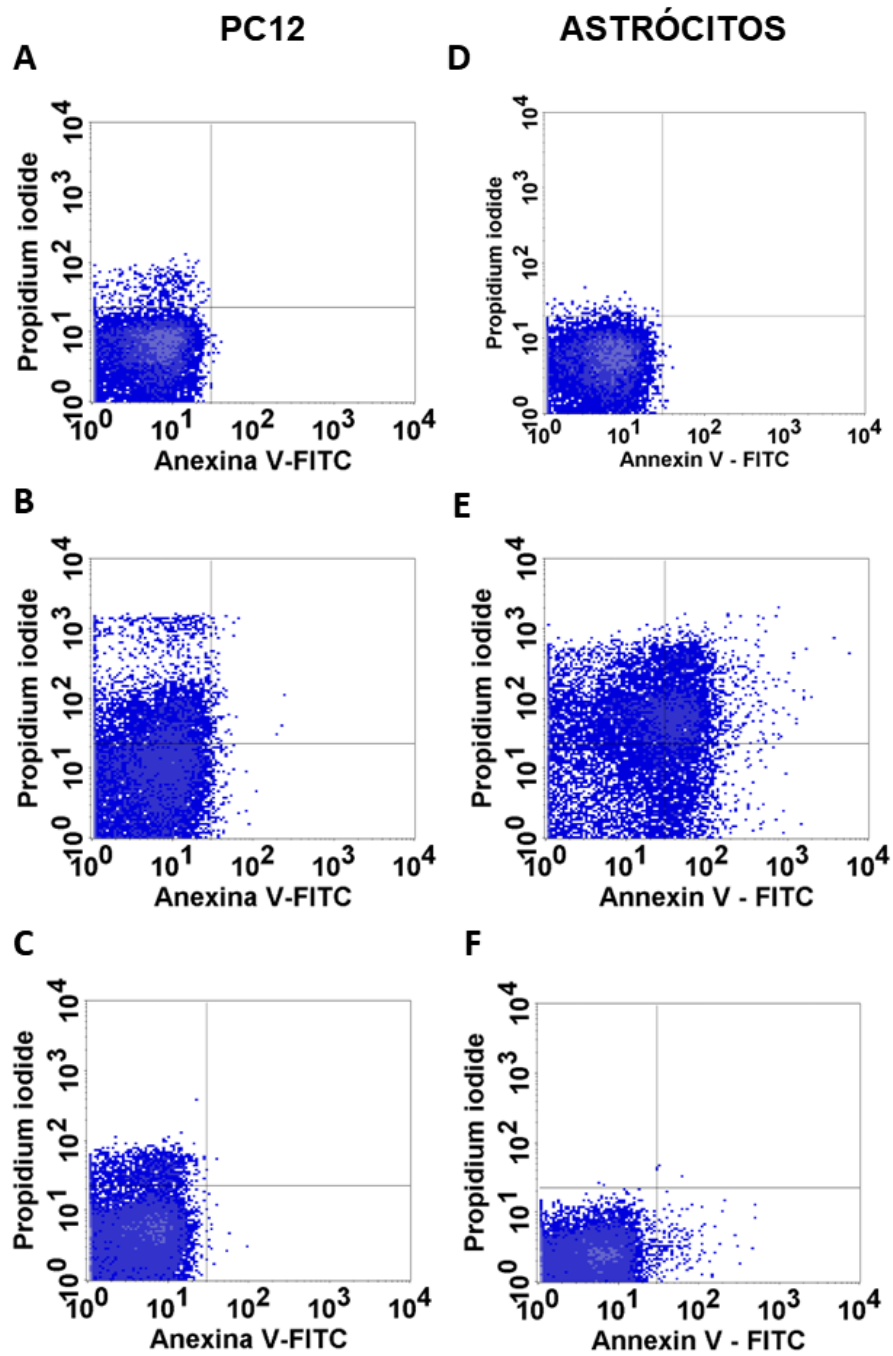
3,45±1,9(%)). Os gráficos da densidade populacional das duas linhagens celulares estão representados na Figura 29.

Figura 28 – Índices de morte celular causada pelo LPS e revertido pelo  $\alpha$ -bisabolol em PC12(A) e Astrócitos (B) nas concentrações de 250 $\mu$ M e 500  $\mu$ M respectivamente, através da marcação de Iodeto de propídeo e Anexina V FITC.



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle negativo; LPS: Lipopolissacarídeo; BIS: (-)- $\alpha$ -bisabolol. \* $p < 0,05$  vs. Grupo controle; # $p < 0,05$  vs LPS.

Figura 29 – Gráficos *density plot* representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por iodeto de propideo (PI), enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V em células PC12 e Astrócitos.



(A) Grupo controle PC12; (B) Grupo controle Astrócitos; (C) células PC12 tratadas com LPS; (D) astrócitos tratados com LPS; (E) células PC12 tratadas LPS + BIS 250μM (F) astrócitos tratados com LPS + BIS 500μM.

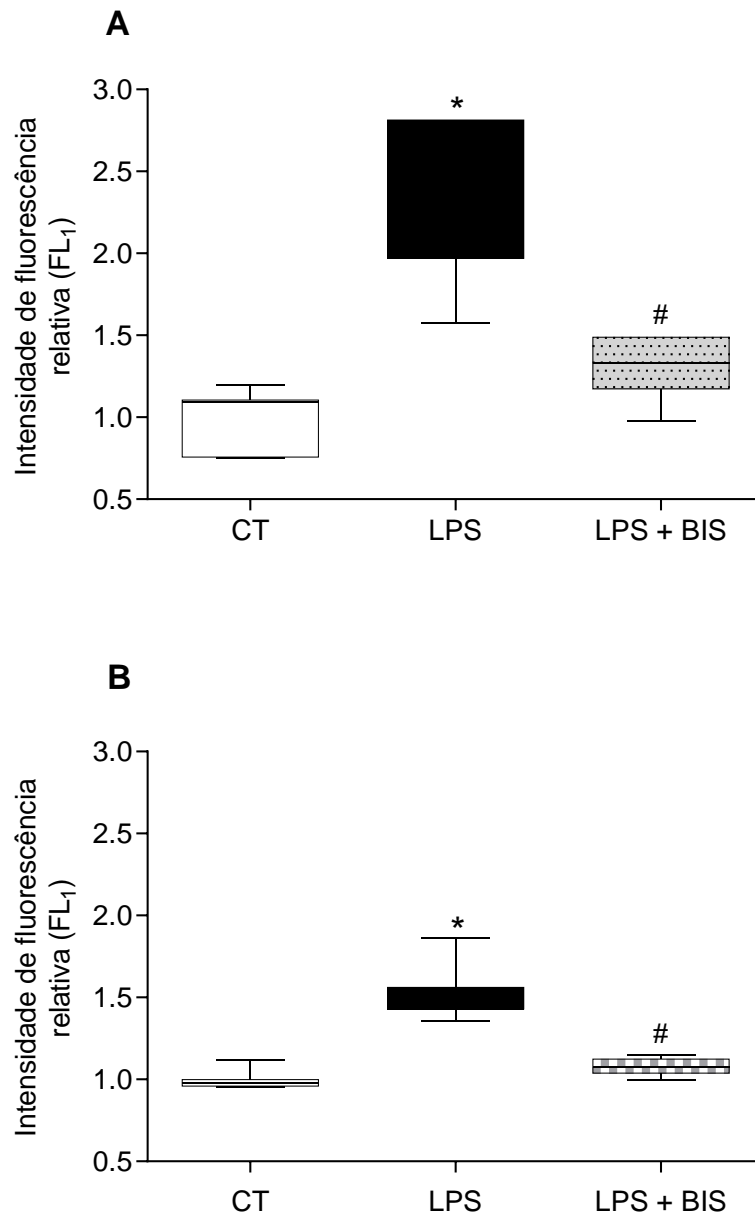
### 5.2.3 *Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)*

A presença de espécies reativas de oxigênio (ERO), que é um dos fatores contribuintes para a morte celular por apoptose devido, principalmente, à oxidação dos lipídios de membrana é um resultado significativo através da medição da fluorescência relativa à oxidação do DCFH-DA. Essa aferência demonstrou que o LPS induziu aumento na produção de ERO em ambas as linhagens testadas (Figura 30).

Em PC12 (Figura 30A), a inflamação dobrou a concentração comparado ao Controle. Já o tratamento com o BIS foi capaz de reverter tais valores (Controle:  $0,9993 \pm 0,053$ ; LPS:  $2,366 \pm 0,136$ ; LPS+BIS:  $1,299 \pm 0,05$ ). Nos Astrócitos (Figura 30B), o tratamento com o BIS reduziu os valores de LPS, demonstrando assim, que o tratamento foi eficaz na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (CT:  $0,9983 \pm 0,017$ ; LPS:  $1,530 \pm 0,048$ ; LPS+BIS:  $1,077 \pm 0,016$ ). Os histogramas representativos das duas linhagens estão representados na Figura 31.

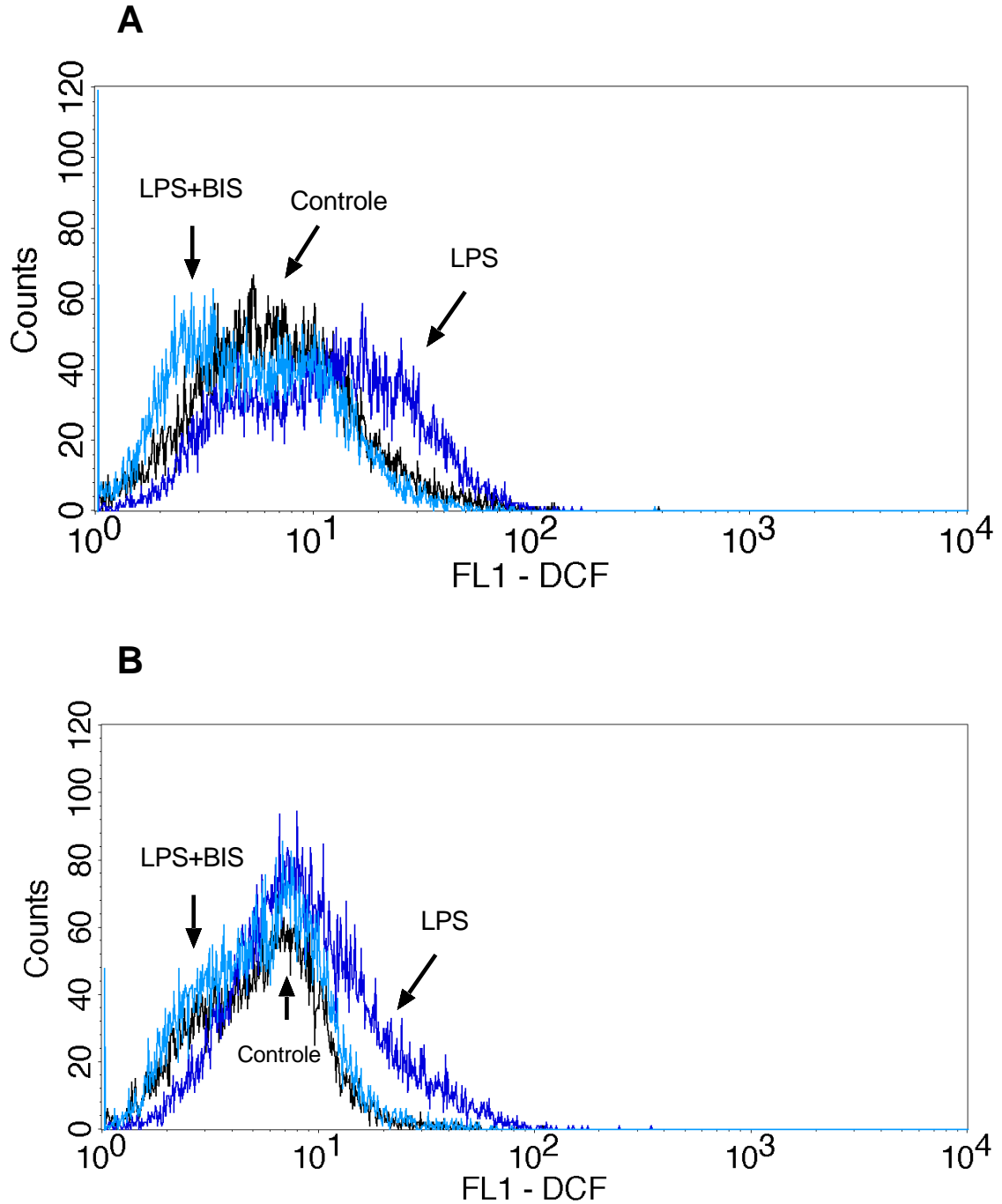


Figura 30 – Mensuração das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em células PC12 (A) e astrócitos (B) após a indução por LPS e o tratamento com  $\alpha$ -bisabolol.



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle negativo; LPS: Lipopolissacarídeo; BIS: (-)- $\alpha$ -bisabolol. \* $p < 0,05$  vs. Grupo controle; # $p < 0,05$  vs LPS.

Figura 31 – Histograma representativo do ensaio de DCFH-DA demonstrando a produção de espécies reativas de oxigênio em células PC12 (A) e astrócitos (B).



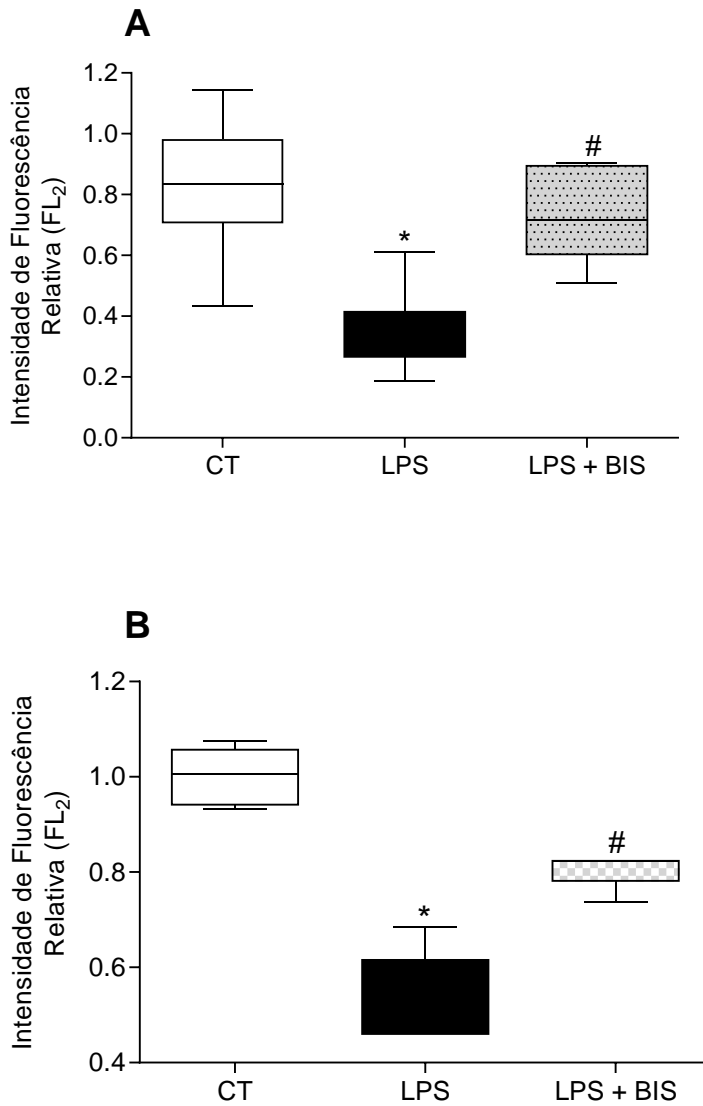
Em A e B estão apresentados o grupo controle em preto, LPS em roxo e o grupo tratado com  $\alpha$ -bisabolol em azul. Os picos representam a contagem de eventos (células) e suas respectivas fluorescências.

#### **5.2.4 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial**

A Figura 32 representa a intensidade de fluorescência relativa de rodamina123, referente ao potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).

Nas células PC12 (Figura 32A) é mostrado que o LPS reduziu a fluorescência comparada ao grupo controle, e o tratamento com o BIS foi capaz de reverter, e aproximar-se do resultado do controle (CT:  $0,82\pm 0,07$ ; LPS:  $0,34\pm 0,04$ ; LPS+BIS:  $0,73\pm 0,05$ ). Em Astrócitos (Figura 32B), o LPS também reduziu a fluorescência comparado ao controle, e o tratamento com o BIS aumentou (CT:  $1,00\pm 0,02$ ; LPS:  $0,53\pm 0,02$ ; LPS+BIS:  $0,50\pm 0,1$ ). Os histogramas das duas linhagens estão representados na Figura 33.

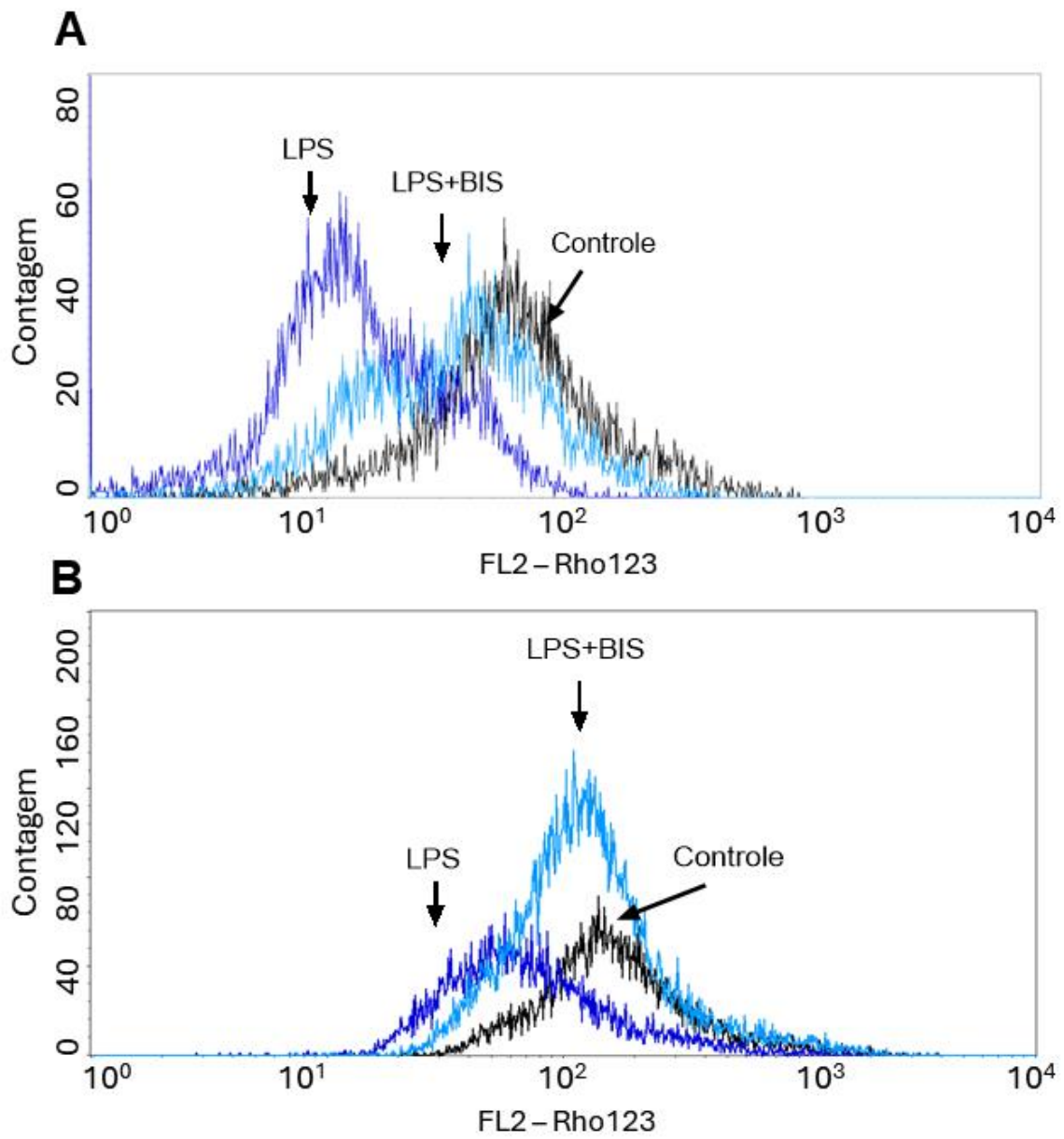
Figura 32 – Efeito do  $\alpha$ -bisabolol no potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de PC12 (A) e Astrócitos (B), nas concentrações de 250  $\mu$ M e 500  $\mu$ M respectivamente.



1

Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle negativo; LPS: Lipopolissacarídeo; BIS: (-)- $\alpha$ -bisabolol. \* $p < 0,05$  vs. Grupo controle; # $p < 0,05$  vs LPS

Figura 33 – Histograma representativo do ensaio de Rodamina123 demonstrando o potencial transmembrânico mitocondrial em células PC12 (A) e astrócitos (B).



Em A e B estão apresentados o grupo controle em preto, LPS em roxo e o grupo tratado com  $\alpha$ -bisabolol em azul. Os picos representam a contagem de eventos (células) e suas respectivas fluorescências.

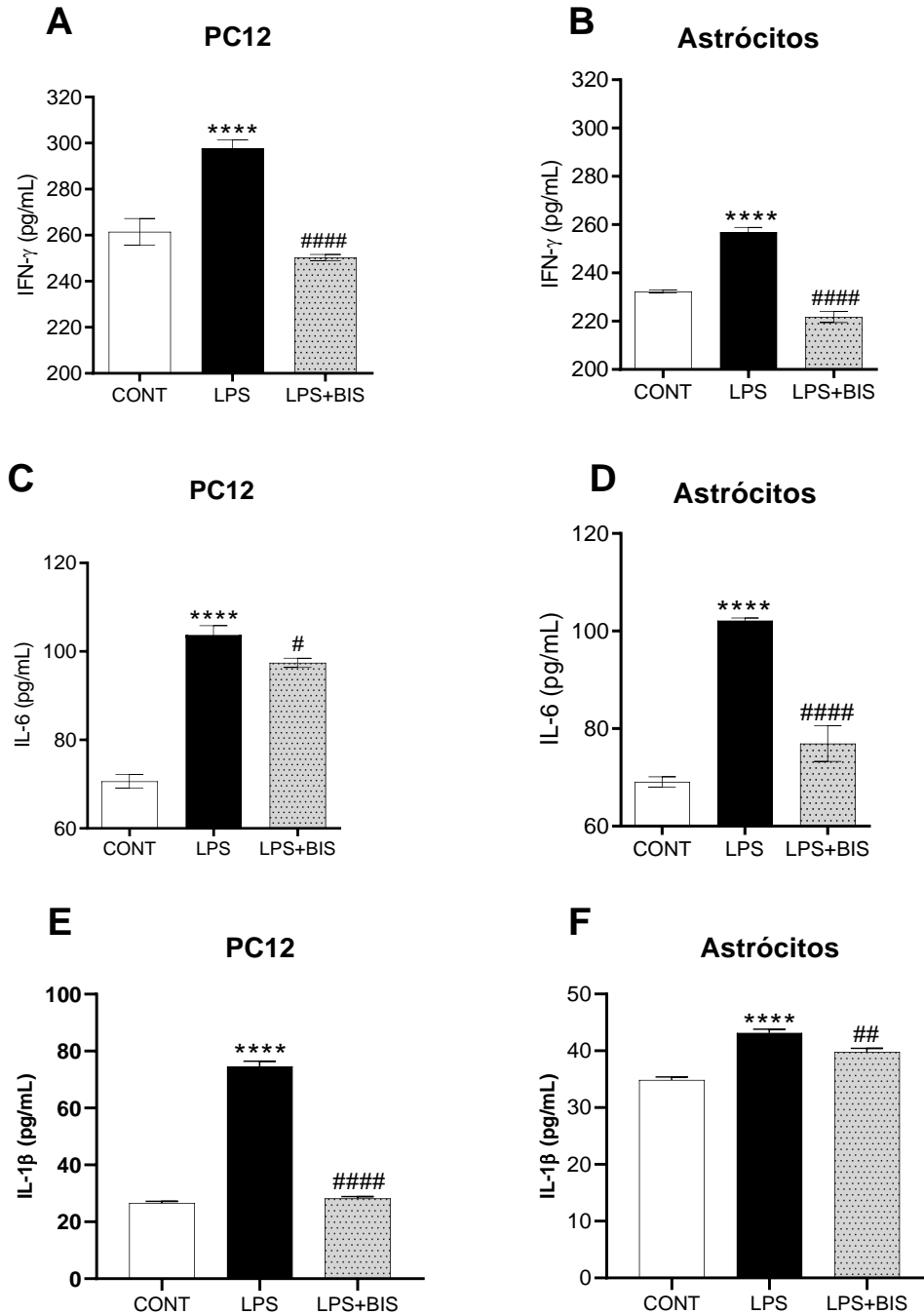
### 5.2.5 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias

Na dosagem de citocinas pro-inflamatórias, percebeu-se diferenças em ambas as linhagens, e nas três citocinas avaliadas. Ao mensurar interferon-gama ( $IFN\gamma$ ) na PC12 (Figura 34A), notou-se aumento de 13% no grupo LPS, quando comparado ao controle. Entretanto, os valores foram reestabelecidos com o tratamento com o  $\alpha$ -bisabolol, reduzindo em 18% (CT:  $261,5\pm 5,8$ ; LPS:  $297,7\pm 3,6$ ; LPS+BIS:  $250,3\pm 1,3$ ). O mesmo comportamento foi visto em astrócitos (Figura 34B), no qual houve aumento em 10% de  $IFN\gamma$  na presença do LPS e reversão no tratamento com o  $\alpha$ -bisabolol em 15% (CT:  $232,3\pm 0,6$ ; LPS:  $256,9\pm 2$ ; LPS+BIS:  $221,7\pm 2,2$ ).

Na mensuração de Interleucina 6 (IL-6), tanto em PC12 quanto astrócitos (Figuras 34C e 34D, respectivamente) houve aumento no grupo LPS ao comparar com o controle. Enquanto em PC12 aumentou 46%, em astrócitos foi 47%, percebendo valores próximos nas duas linhagens. Ao tratar com o  $\alpha$ -bisabolol, foi visto uma redução de 9% em PC12 e 36% em astrócitos ao comparar com o LPS (PC12: CT:  $70,6\pm 1,5$  LPS:  $103,7\pm 2,1$ ; LPS+BIS:  $97,4\pm 1,0$ ; Astrócitos: CT:  $69,0\pm 1,0$ ; LPS:  $102,1\pm 0,5$ ; LPS+BIS:  $76,9\pm 3,6$ ).

Nos níveis de Interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), tanto em PC12 quanto em astrócitos (Figura ZE e ZF), houve aumento no grupo LPS. Em PC12 esse aumento duplicou, e o tratamento com o BIS reduziu aos níveis próximo ao controle (CT:  $26,54\pm 0,6$ ; LPS:  $74,66\pm 1,8$ ; LPS+BIS:  $28,20\pm 0,68$ )(Figura 34E). Em Astrócitos o aumento no grupo do LPS foi de 23% comparado ao grupo controle, e o tratamento com o bisabolol reverteu 7% desse valor (CT:  $34,84\pm 0,5$ ; LPS:  $43,14\pm 0,6$ ; LPS+BIS:  $39,82\pm 0,6$ )(Figura 34F).

Figura 34 – Avaliação da modulação inflamatória induzida pelo LPS e tratado com  $\alpha$ -bisabolol na mensuração de Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 1 $\beta$  (IL1  $\beta$ ). Quantificação de IFN $\gamma$  em PC12 (A) e Astrócitos (B), de IL-6 em PC12 (C) e Astrócitos (D), e de IL1  $\beta$  em PC12 (E) e Astrócitos (F), com o tratamento de  $\alpha$ -bisabolol na concentração de 250 $\mu$ M (PC12) e 500 $\mu$ M (Astrócitos) respectivamente.



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle negativo; LPS: Lipopolissacarídeo; BIS: (-)- $\alpha$ -bisabolol. \* $p < 0,05$  vs. Grupo controle; # $p < 0,05$  vs LPS.

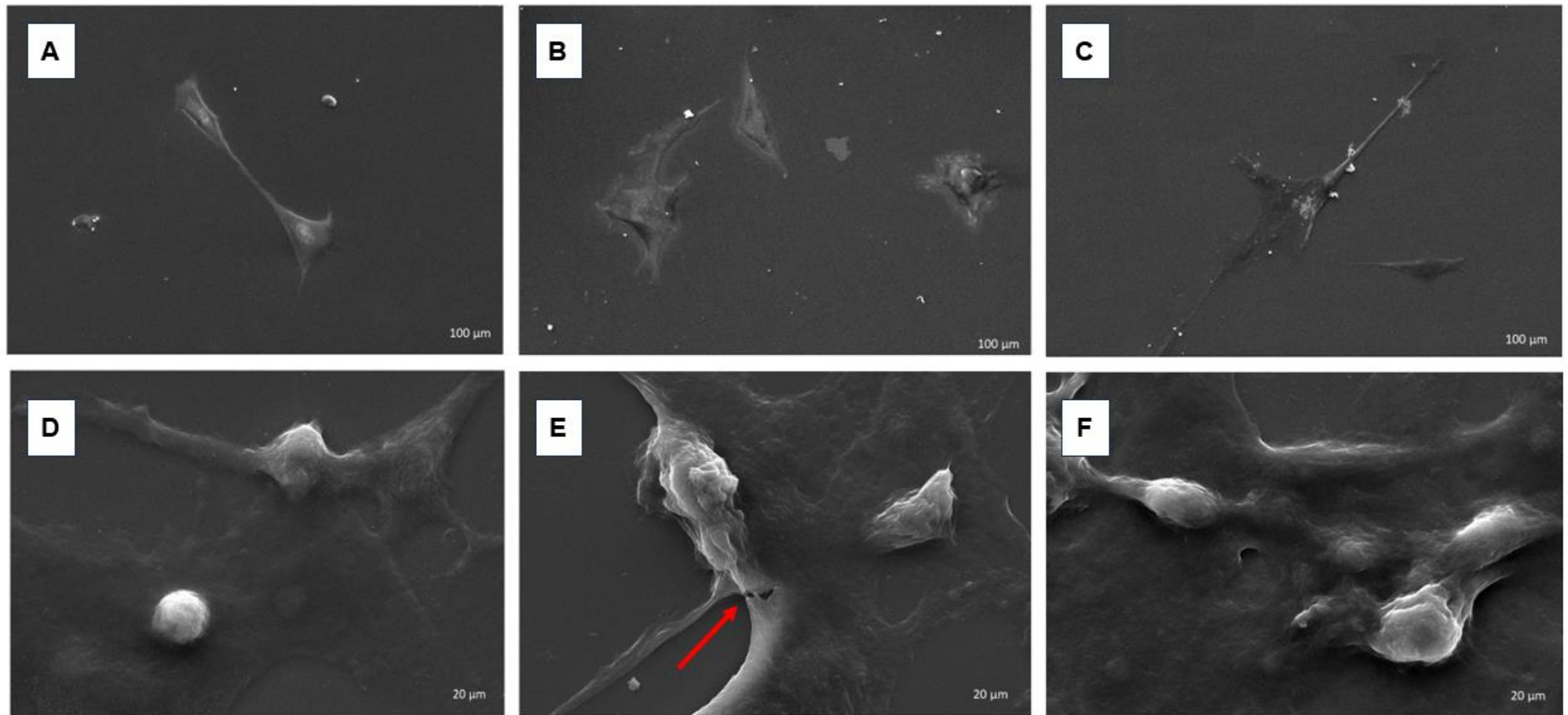
### 5.2.6 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

Na Figura 35 está representada a morfologia de PC12. Nota-se que o controle de PC12 (Figura 35A) apresenta uma célula com formato poligonal, com ramificações dendríticas e citoplasma definido, característica da PC12 aderente. Já na presença do LPS (Figura 35B) é perceptível a desorganização citoplasmática e a possível formação de corpo apoptótico, demonstrando alteração causada pela presença do lipopolissacarídeo. Ao tratar essas células com o  $\alpha$ -bisabolol (Figura 35C) é visto uma estruturação citoplasmática e próxima ao controle, com possível redução de danos provocado pelo LPS.

Os Astrócitos sem tratamento (Figura 35D) apresentaram formato estrelado e com prolongamentos dendríticos e grande volume citoplasmático. Na presença do LPS (Figura 35E) verificou-se rompimento celular. Ao tratar com BIS (Figura 35E) verificou-se características similares às células sem tratamento.



Figura 35 – Representação da morfologia das células PC12 sem tratamento (A), tratadas com LPS(50µg/ml) (B) e com LPS (50µg/ml) + BIS (250µM) (C) e Astrócitos sem tratamento (D), com LPS (50µg/ml) (E) e com LPS(50µg/ml) + BIS (500µM) através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



Fonte: As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ( $\times 50.000$ ). A marcação em vermelho na Figura XE refere-se à localização do rompimento celular.

### 5.3 *Docking molecular*

A utilização de métodos computacionais para simular a identificação de novos medicamentos, tornou-se uma ferramenta indispensável para economia de recursos e garantir a especificidade dos testes experimentais.

O presente trabalho trouxe três possíveis alvos preditivos para o mecanismo molecular no qual o BIS atua. Os parâmetros gerados nesta predição foram: a energia de ligação da molécula com a proteína, o valor de *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD), as ligações de hidrogênio e as ligações hidrofóbicas. Verificou-se que o valor de RMSD nas três proteínas testadas, deu-se menor que 2, o que é considerado satisfatório. Na Tabela 1 são mostrados os parâmetros de interação do BIS com as proteínas TLR4, HMOX e PI3K.

Tabela 1 – Parâmetros gerados a partir da ancoragem molecular do  $\alpha$ -bisabolol com as proteínas de ligação TLR4, HMOX e PI3K, e a energia de ligação da molécula controle de cada receptor.

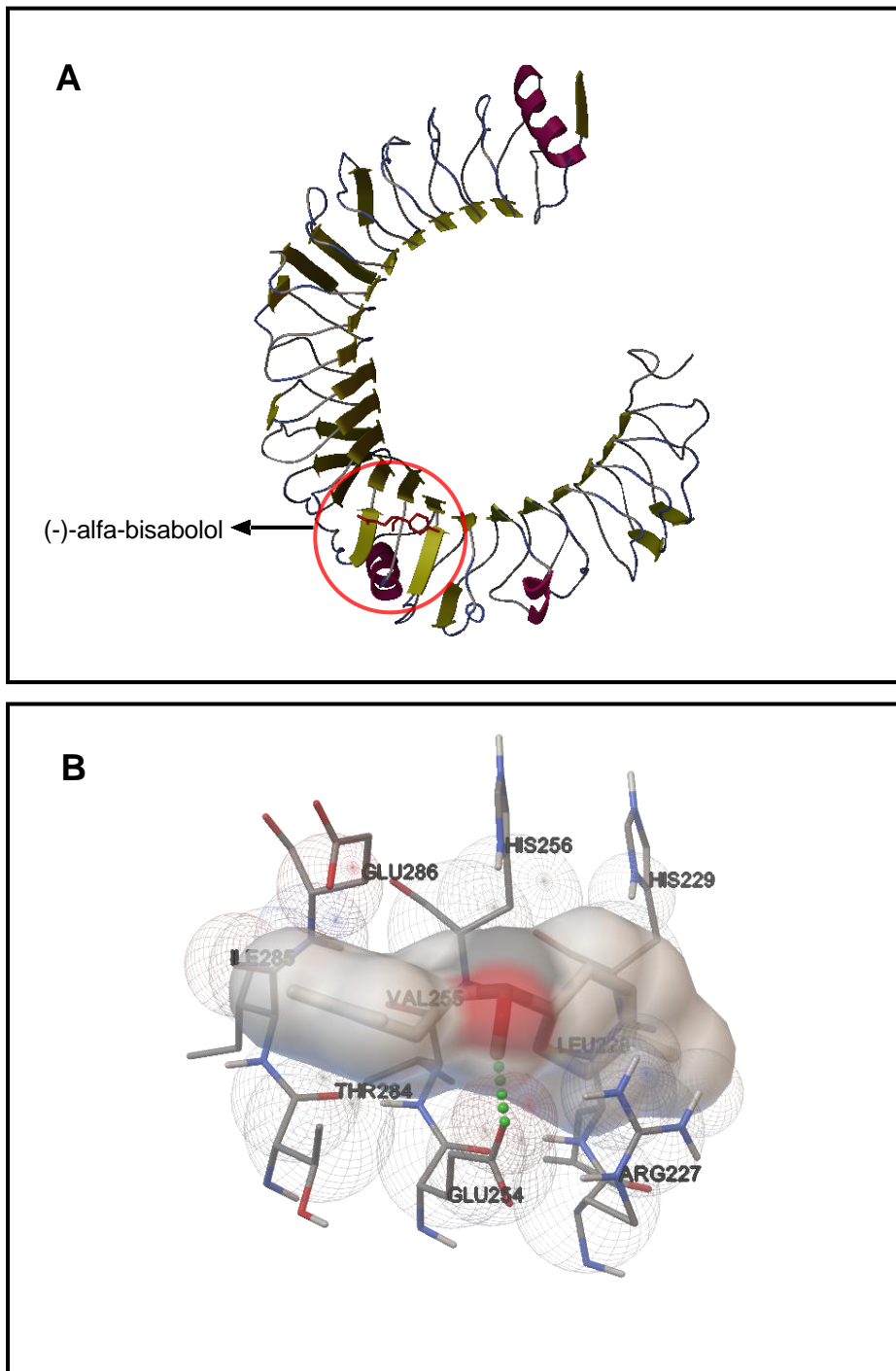
<b>Proteínas</b>	<b>Energia de Ligação</b>	<b>Energia do controle</b>	<b>RMSD</b>	<b>Ligações de hidrogênio</b>	<b>Ligações hidrofóbicas</b>
<b>TLR4</b>	-6,28	-8,07	1,09	GLU254	GLU286
					HIS256
					HIS229
					VAL255
					ILE285
					LEU228
					ARG227
THR284					
<b>HMOX</b>	-7,85	-8,08	0,95	ILE65	GLU66
					GLU62
					LYS86
					LEU83
					PRO80
					VAL77
					TYR78
					PHE79
<b>PI3K</b>	-7,80	-9,47	1,78	TRP355	VAL604
					GLN601
					LYS421
					LYS531
					LEU423
					ALA528
					PRO424
					PRO526
ILE469					

### 5.3.1 TLR4

A análise dos resultados foi baseada na interação do composto (ligante)  $\alpha$ -bisabolol com o receptor transmembrana do tipo *toll-like* 4 (TLR4). O redocking utilizando molécula de resatorvid (energia de ligação: -8,07 kJ/mol), um potente inibidor de TLR4, para comprovação do ensaio também foi realizado.

A menor energia de ligação, ou seja, a energia mais estável de ligação do  $\alpha$ -bisabolol foi de -6,28 kJ/mol. Foi observado uma ligação de hidrogênio entre  $\alpha$ -bisabolol e o aminoácido GLU254 (glicina) (Figura 36A). As demais interações, como por exemplo, força de Van der Waals, estão representadas no item B da Figura 36 e na Tabela 1.

Figura 36 – *Docking molecular* evidenciando a ligação entre porção TLR4 e do  $\alpha$ -bisabolol.

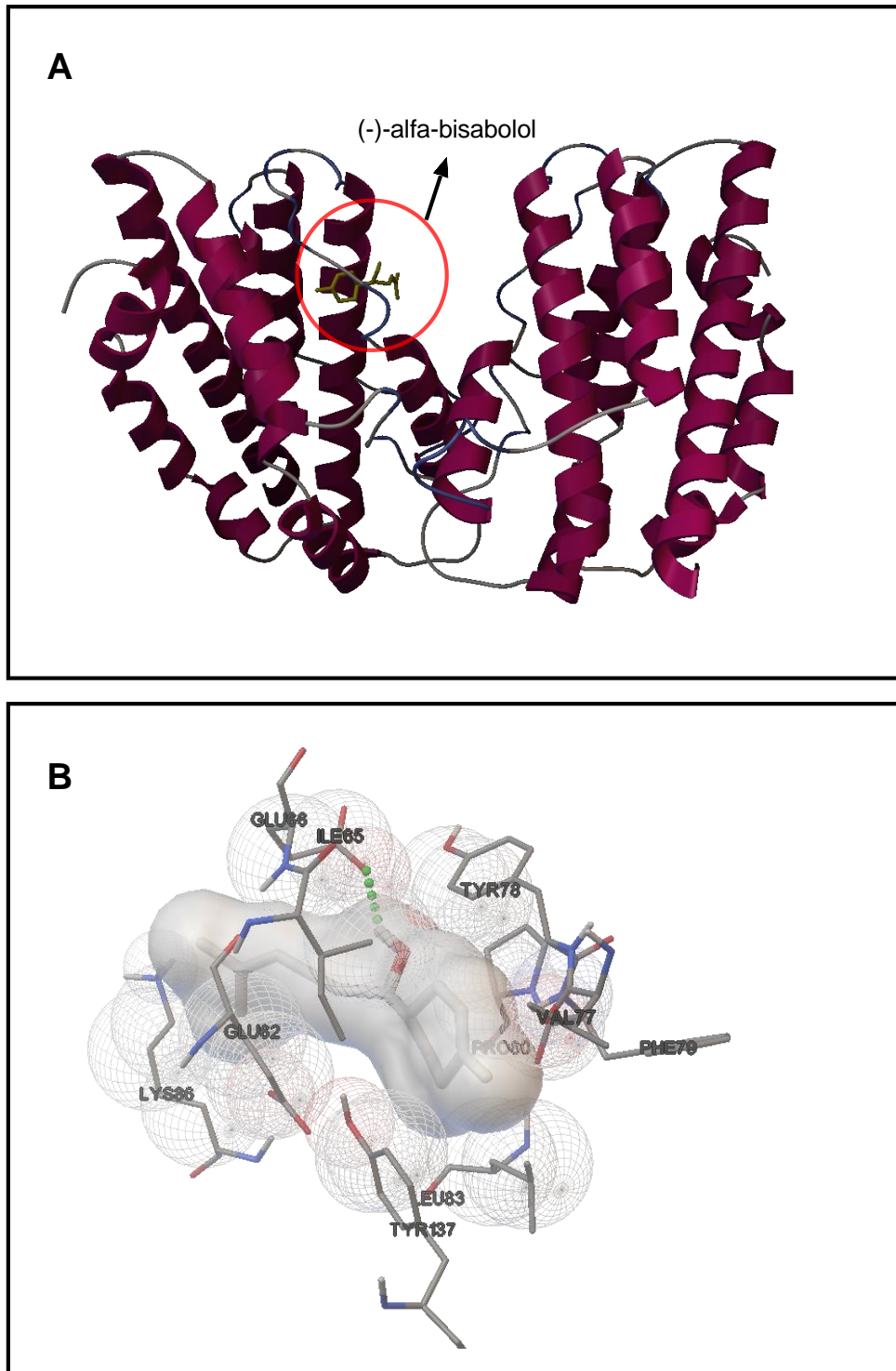


### 5.3.2 HMOX

A análise dos resultados foi baseada na interação do composto (ligante)  $\alpha$ -bisabolol com a enzima heme oxigenase (HMOX1). O redocking utilizando molécula de 1-(adamantan-1-yl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethanona (AD8) (energia de ligação: -8,08 kJ/mol), um inibidor de HMOX1 já descrito, para comprovação do ensaio também foi realizado.

A menor energia de ligação, ou seja, a energia mais estável de ligação do  $\alpha$ -bisabolol foi de -7,85 kJ/mol semelhante a energia observado para o controle positivo AD8. Foi observado uma ligação de hidrogênio entre  $\alpha$ -bisabolol e o aminoácido ILE65 (interleucina) (Figura 37A). As demais interações, como por exemplo força de Van der Waals, estão representadas no item B da Figura 37 e na Tabela 1.

Figura 37 – *Docking molecular* evidenciando a ligação entre porção do HMOX e do  $\alpha$ -bisabolol .

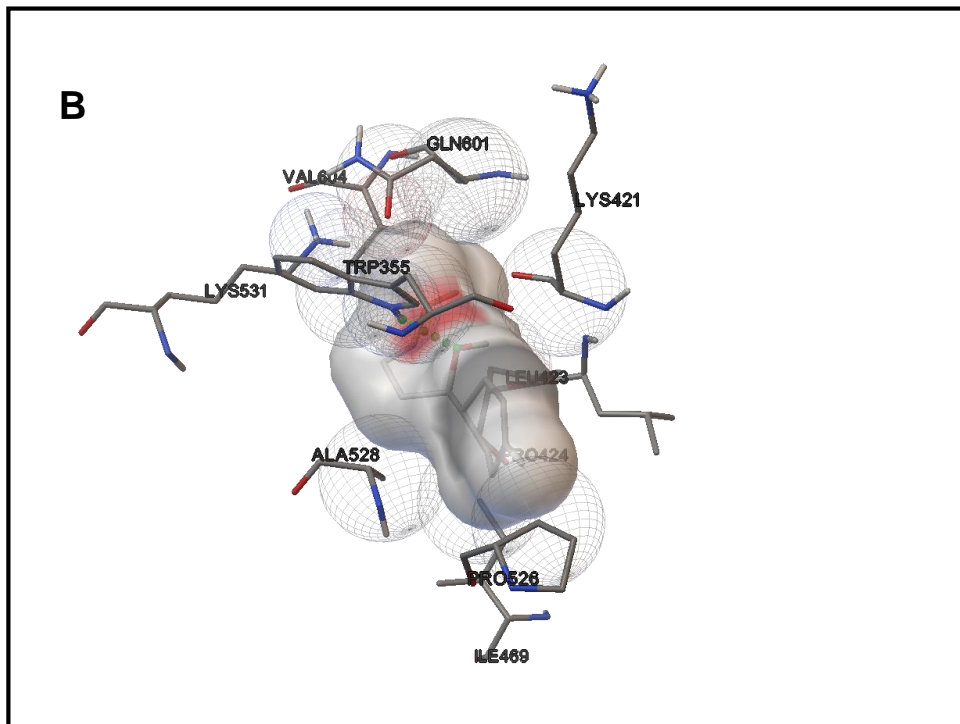
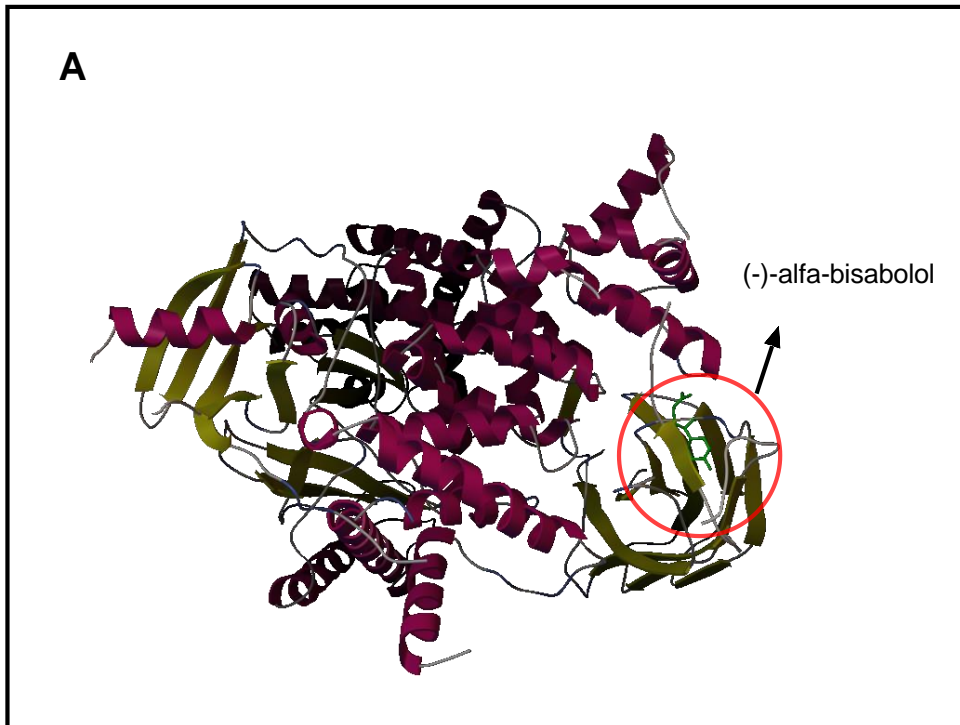


### 5.3.3 PI3K

A análise dos resultados foi baseada na interação do composto (ligante)  $\alpha$ -bisabolol com a enzima fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K). O *redocking* utilizando molécula de wortamanin (KWT) (energia de ligação: -9,47 kJ/mol), um inibidor covalente de PI3K, para comprovação do ensaio também foi realizado.

A menor energia de ligação, ou seja, a energia mais estável de ligação do  $\alpha$ -bisabolol foi de -7,8 kJ/mol. Foi observado uma ligação de hidrogênio entre  $\alpha$ -bisabolol e o aminoácido TRP355 (triptofano) (Figura 38A). As demais interações, como por exemplo força de Van der Waals, estão representadas no item B da Figura 38 e na Tabela 1.



Figura 38 – *Docking molecular* evidenciando a ligação entre porção PI3K e do  $\alpha$ -bisabolol

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresentou efeito do  $\alpha$ -bisabolol (BIS) na reversão dos comportamentos do tipo depressivo e ansioso-símile, e ao prejuízo da memória de curto prazo induzidos pelo lipopolissacarídeo (LPS), que possui função inflamatória, alteração nos níveis de espécies oxidantes e nitrosativas, além de atuar em citocinas no hipocampo e córtex pré-frontal. Além disso, a nível dos ensaios *in vitro*, verificou-se que o BIS possui efeito neuroprotetor em células PC12 e astrócitos, desafiadas com o LPS. Tal efeito, foi demonstrado através da redução de espécies reativas de oxigênio e da manutenção da função mitocondrial, indicando um potencial antioxidante em ambas as linhagens celulares. Além disso, o tratamento com o BIS foi capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias, proteger contra a morte celular em ambas as linhagens, além de reduzir danos quanto à morfologia celular.

A predição de alvos *in silico* mostrou que a estabilidade energética entre a ligação do BIS e os componentes TLR4, HMOX e PI3K indica uma possível interação que pode estar relacionada aos efeitos farmacológicos observados. Estes resultados são importantes pois abre um leque de possibilidades para aprofundar-se no estudo experimental desses alvos, e por conseguinte, o estudo translacional a nível de potencial uso em transtornos do Sistema Nervoso Central (SNC), como para a depressão.

Estudar novas substâncias para o tratamento de doenças que afetam o SNC, como a depressão, é desafiador, visto que esta é uma doença multifacetada, na qual há o envolvimento de aspectos não somente biológicos, mas também sociais. Para explicar a etiologia da depressão, vários aspectos são considerados, como: fatores neuroendócrinos envolvidos com o desequilíbrio do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), o papel crítico da neuroplasticidade, a desregulação monoaminérgica, alterações no eixo intestino-cérebro, além do aumento do estresse oxidativo e da inflamação (DOS SANTOS et al., 2023).

Buscamos investigar o papel do BIS frente à inflamação e alterações no estresse oxidativo induzidas pela exposição ao LPS, que tem sido comprovadamente utilizado como um fator de indução de comportamentos do tipo depressivo em roedores, como camundongos. (LI et al., 2023b).

No presente estudo, verificou-se que no teste do campo aberto, os animais submetidos ao tratamento com o LPS apresentaram menor quantitativo no número de *crossing* e entradas na zona central, e aumento no número de *rearing*. O mesmo resultado foi demonstrado por SALMANI et al., (2022). Ao tratar com BIS, houve uma reversão nos parâmetros de *rearing* e na frequência de entradas na zona central.

O campo aberto é um teste que avalia a atividade locomotora dos animais, e é importante para avaliar o efeito das substâncias, para excluir a possibilidade de efeito psicoestimulante ou relaxante, e assim prejudique os testes seguintes. Além disso, é importante ressaltar que é da natureza do animal que haja curiosidade no ambiente novo, portanto, ao passar menos tempo na área central, indica um comportamento do tipo ansioso, visto que a periferia se torna um ambiente mais seguro. O comportamento de *rearing* representa um indicativo de que o animal está ansioso-like, representando medo e necessidade de fuga do local. Outros trabalhos demonstraram resultado semelhante (CHEN et al., 2024; HEALEY et al., 2023; HERRERA-ISAZA et al., 2023; LI et al., 2023b).

O aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, redução da preferência pela solução de sacarose, e redução na frequência e no tempo de *grooming* no teste de *Splash*, nos animais expostos ao LPS. Esses resultados demonstram comportamento do tipo depressivo, pois, enquanto saudáveis, os animais tendem a sobressair do nado forçado e não apresentam o estado de anedonia representado pela *redução* do consumo de sacarose. Naturalmente, os animais tendem ao instinto exploratório em ambientes novos, entretanto, a dificuldade de habituação suscita maior comportamento estereotipado, como é o caso do *grooming* no teste de *Splash*. Foi verificado em outros estudos que esse comportamento está relacionado ao desconforto e sofrimento emocional do animal (ROJAS-CARVAJAL; BRENES, 2020). Outros trabalhos corroboram com os achados, evidenciando os mesmos comportamentos dos animais expostos ao LPS (ADEOLUWA et al., 2023; FANG et al., 2020; FRENOIS et al., 2007).

O  $\alpha$ -bisabolol foi capaz de reverter esses comportamentos, mostrando potencial antidepressivo nesse modelo. Em um estudo anterior do grupo verificou-se resultados semelhantes do BIS no modelo de indução do comportamento depressivo-símile através do estresse crônico imprevisível (REBOUÇAS., 2019).

Adeoluwa et al., (2023) realizaram um estudo de análise correlacional entre os comportamentos e verificaram que a redução do tempo de imobilidade está associada com o aumento da preferência pela solução de sacarose. Um estudo com o óleo essencial de *Ferula gummosa*, no qual possui o BIS na sua composição, apresentou resultados similares nos parâmetros avaliados (ABBASI-MALEKI et al., 2023).

Estudos utilizando outros terpenos, como o limoneno e o terpineol, verificaram a redução nos parâmetros testados no presente trabalho: redução do tempo de imobilidade, redução na frequência de *grooming* no teste do *Splash*. Importante destacar que o trabalho utilizando o terpineol fez a indução do comportamento depressivo-símile como LPS, corroborando como presente trabalho (LORIGOOINI et al., 2021; VIEIRA et al., 2020).

A ansiedade, apesar de ser uma reação natural e importante do corpo em resposta à uma situação de risco, quando apresenta-se com o transtorno depressivo maior (TDM) representa uma comorbidade preocupante, visto que pode levar o indivíduo à incapacidade das atividades habituais. Os modelos existentes para avaliar o comportamento do tipo ansioso em camundongos trata-se dos testes de labirinto em cruz elevada e da placa perfurada. Esses testes são descritos como ansiedade de “estado”, em que há a indução do comportamento utilizando um estressor, como é o caso da administração do LPS (HUFFSTETLER et al., 2023).

Aqui, verificou-se que o LPS reduziu o número de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevada. Quanto ao teste da placa perfurada, houve redução dos “mergulhos” nos orifícios da placa. O mesmo foi observado em outros estudos com o mesmo modelo (CHEN et al., 2023; CUSKELLY et al., 2022; MURRAY et al., 2019; OMACHI; MATSUYAMA; HASEGAWA, 2023; USHIO et al., 2022).

O tratamento com o  $\alpha$ -bisabolol foi capaz de reverter o comportamento, aumentando o número e o tempo de permanência nos braços abertos e o número de “mergulho” nos orifícios da placa perfurada. Estudos utilizando outros modelos de indução do comportamento do tipo ansioso, como o estresse crônico imprevisível, mostrou efeito semelhante do BIS nesses testes. Além disso, o estudos utilizando outros terpenoides no modelo de LPS apresentou efeito semelhante ao BIS no presente estudo (AKTER et al., 2022; WESTON-GREEN; CLUNAS; JIMENEZ NARANJO, 2021; REBOUÇAS 2019)

Um dos prejuízos evidenciados pela exposição ao LPS, é o comprometimento cognitivo. Uma das formas de avaliar é através do labirinto em Y que permite identificar a memória de curto prazo, demonstrando que, ao estar intacta, sugere que o córtex pré-frontal esteja com suas funções preservadas. Outro parâmetro avaliado nesse teste é a memória espacial, que destaca o funcionamento hipocampal (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019).

No presente estudo verificou-se que o LPS foi capaz de induzir redução no número de entradas corretas no teste do labirinto em Y. Ao estar com a memória de curto prazo comprometida, os animais tendem a não lembrar do braço previamente explorado. Tal comportamento foi visto em outros trabalhos também utilizando o LPS (ALAM; KRISHNAMURTHY, 2022; WU et al., 2022; ZHANG et al., 2021).

O  $\alpha$ -bisabolol foi capaz de aumentar o percentual de alternâncias corretas, revertendo o comportamento induzido pelo LPS. Em um estudo utilizando modelo de isquemia cerebral, tratando com o BIS, verificou-se a mesma reversão na memória de curto prazo, além de ter mostrado também que o BIS foi capaz de reverter prejuízos à memória de longo prazo. Em um modelo de amnésia induzida pela escopolamina em ratos, o extrato alcóolico de *Matricaria*

*chamomilla*, no qual apresenta como composto majoritário o BIS, apresentou reversão no parâmetro de entradas corretas no labirinto em Y, corroborando com o presente trabalho (ALI ESMAIL AL-SNAFI; LAWAHIDH FALI HASHAM, 2023; FERNANDES et al., 2019).

Já é sabido que, além da indução de comportamentos depressivo, ansioso-símile e prejuízos à memória, a injeção sistêmica de LPS também provoca expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro, assim como aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LI et al., 2023b). As espécies reativas, tanto de oxigênio, quanto de nitrogênio, quando em excesso, promulgam a ocorrência de danos celulares, afetando lipídeos, proteínas e o DNA. Entretanto, por possuírem meia-vida curta há limitações quanto à mensuração desses parâmetros (BLACK et al., 2015).

No presente trabalho, o LPS induziu o aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de nitrito, tanto no hipocampo, quanto no córtex pré-frontal. Tais parâmetros foi corroborado em outros trabalhos, evidenciando que a exposição ao LPS traz prejuízos nessas áreas cerebrais. (AL-AMIN et al., 2018; WENG et al., 2024). O tratamento com o BIS reduziu os níveis de TBARS no hipocampo e de nitrito nas duas áreas. Outros estudos evidenciaram o efeito antioxidante do BIS, atuando como redutor da peroxidação lipídica (MEERAN et al., 2018; NAGOOR MEERAN et al., 2019).

Importante destacar que apesar de haver a redução da peroxidação lipídica, e dos níveis de nitrito, há a ocorrência da baixa produção de enzimas antioxidantes como a glutathione reduzida (GSH). Black et al., (2015) constatou que pacientes depressivos possuíam níveis séricos aumentados de ERO, mas ao comparar com pacientes saudáveis, não havia aumento de espécies antioxidantes, corroborando com o presente trabalho (AL-AMIN et al., 2018).

Foi demonstrado que a formação de espécies reativas está intrinsecamente relacionada com os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), interleucinas  $1\beta$  e 6, e interferon-gama ( $IFN-\gamma$ ). Sob uma indução inflamatória há a ocorrência de passagem para as áreas cerebrais dessas moléculas, que está associado com a ocorrência de algumas doenças do SNC (AL-AMIN et al., 2018).

A presença do LPS, no presente estudo, causou aumento de  $IL-1\beta$  no córtex pré-frontal, e redução de  $IL-6$  nas duas áreas. Em contrapartida, o tratamento com O BIS foi capaz de reduzir os níveis de  $IL-1\beta$  e aumentar os níveis de  $IL-6$ . Em um modelo de cardiotoxicidade aguda induzida por doxorrubicina em ratos, o BIS foi capaz de reverter os níveis de citocinas pró-inflamatórias (NAGOOR MEERAN et al., 2023).

Para avaliar a citotoxicidade do BIS nas células testadas, realizou-se o teste da redução do MTT. Percebeu-se que em PC12, as concentrações de 1000 e 500 $\mu$ M foram tóxicas,

enquanto apenas a de 1000 $\mu$ M foi em astrócitos. Dessa forma, tais concentrações foram excluídas para a continuação do trabalho. Tal evento foi verificado também em estudo anterior com células renais, corroborando as mesmas concentrações do presente estudo (SAMPAIO et al., 2019).

É importante mencionar que o BIS, por apresentar baixa toxicidade, está incluso na categoria de Geralmente Reconhecido como Seguro, pela *Food and Drug Administration* (FDA). Além disso, foi demonstrado não apresentar toxicidade em camundongos, cães e macacos e de apresentar baixa citotoxicidade em células de mamífero, demonstrado em trabalhos tanto com o BIS quanto com o óleo essencial das flores de *Matriarca chamomilla*, no qual apresenta majoritariamente a presença do  $\alpha$ -bisabolol (EDDIN et al., 2022; JEYAKUMAR et al., 2019; SAMPAIO et al., 2019; SRIVASTAVA; GUPTA, 2007).

A exposição de células à uma ameaça, seja ela de cunho inflamatório ou lesão física, submete-as a um estado de vulnerabilidade podendo levá-las à morte. Tal evento pode ser classificado como apoptose ou necrose. No presente estudo, enquanto com os astrócitos não ocorreu alteração a nível de morte celular, as células PC12 ao serem expostas ao LPS verificou-se marcação positiva para iodeto de propídeo e para anexina, em diferentes eventos, representando morte celular por apoptose tardia e por necrose.

Ao tratá-las com o BIS percebeu-se uma redução nos dois tipos de morte celular. Em um estudo envolvendo modelo de Parkinson em animais, induzido pela rotenona, o BIS apresentou efeito anti-apoptótico (JAVED et al., 2020). Bai et al., 2022, verificaram que o LPS promoveu apoptose em células PC12, corroborando com os presentes resultados. Além disso, a exposição de células da linhagem Neuro2a ao peptídeo neurotóxico beta-amilóide, o BIS apresentou potencial anti-apoptótico (BAI et al., 2022; SATHYA; SHANMUGANATHAN; DEVI, 2020).

O estresse oxidativo é uma característica notável em um tecido lesionado, seja a nível celular ou sistêmico. Estudos mostram que há relação entre o aumento de espécies reativas de oxigênio e o comprometimento neuronal, ou seja, a regulação da produção desses compostos é vista como uma estratégia de neuroproteção. No presente estudo, ao avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio nas linhagens celulares, através do corante de DCFH-DA, notou-se que o BIS foi capaz de reduzir em comparação ao grupo exposto ao LPS. Em um estudo com modelo de Alzheimer, verificou-se comportamento similar do BIS em células N2a expostas ao peptídeo beta-amilóide (SHANMUGANATHAN et al., 2019).

A função mitocondrial regular é um fator inerente para o metabolismo energético de uma célula neuronal. Ou seja, a disfunção na mitocôndria está associada à doenças, e, além

disso, está intrinsecamente relacionada com o processo de estresse oxidativo, que pode causar lesão neuronal (NAGOOR MEERAN et al., 2019).

No presente trabalho, ao avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial das células expostas ao LPS e tratadas com o BIS, através do teste de Rodamina 123, verificou-se o efeito do BIS em aumentar a fluorescência, indicando redução de danos referentes ao potencial transmembrânico mitocondrial. Liu et al., (2023) estudaram os efeitos neuroprotetores do piceatanol, um análogo químico do resveratrol, contra a disfunção mitocondrial em células PC12, e verificaram efeito semelhante ao encontrado no presente estudo com o BIS (LIU et al., 2023).

Muitos estudos já relataram o potencial anti-inflamatório do  $\alpha$ -bisabolol. No presente trabalho foi verificada a redução das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$  em ambas as linhagens celulares. Um estudo utilizando LPS para induzir inflamação em células PC12, verificou aumento considerável de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, corroborando com o presente trabalho (BAI et al., 2022).

Foi relatado, em um estudo utilizando 10 $\mu$ g/ml de BIS em macrófagos estimulados por LPS, redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF $\alpha$  (MAURYA et al., 2014). Em um modelo de Parkinson, induzido pela rotenona, em ratos, o BIS foi capaz de reduzir a ativação glial e promover a redução de IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (JAVED et al., 2020). Tais resultados podem ser justificados pela predição de alvos feita por Maurya et al., (2014) no qual demonstraram a alta afinidade do BIS com citocinas pró-inflamatórias.

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina pró-inflamatória que é liberada em resposta à uma lesão. De Cicco et al., (2023) observaram o efeito anti-inflamatório dos óleos essenciais da camomila, no qual possui composto majoritário o (-)- $\alpha$ -bisabolol, através da utilização de macrófagos diferenciados por IFN- $\gamma$  e o LPS. Outro estudo utilizando macrófagos, micróglia e astrócitos, foi feita a exposição destas ao LPS e ao IFN- $\gamma$ . Ao tratar com um éster denominado Cinameína, houve uma inibição de espécies reativas de nitrogênio. No presente estudo foi visto que o tratamento com o BIS foi capaz de reverter as concentrações de IFN- $\gamma$  nas células tratadas com o LPS, o que sugere efeito anti-inflamatório nesse modelo (PAHAN et al., 2023).

Quando uma célula se encontra em um ambiente inapropriado para seu crescimento, diferenciação e divisão, as mudanças começam ocorrer pela alteração das características morfológicas. Em células do SNC, como neurônios e astrócitos, é comum buscar-se entender o funcionamento e a morfologia para verificar a resposta a danos. (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2019). Nesse estudo verificou-se modificações na morfologia das linhagens celulares quando expostas ao LPS e após o tratamento com o BIS através da microscopia eletrônica de varredura.

PC12 são células originadas de feocromocitoma adrenal de ratos que se apresentam de duas formas: indiferenciadas e diferenciadas. A primeira, na qual foi a utilizada no presente trabalho, são células aderentes e muito utilizada em diversos estudos envolvendo a busca de novos potenciais terapêuticos, porém, há uma extensa aplicabilidade na área de neurobiologia. O estudo de neurotoxicidade de substâncias, por exemplo, é uma das vertentes bem estabelecidas com a utilização de PC12 (LU et al., 2023; SHI et al., 2023; WU et al., 2023c; ZHU et al., 2023) SHI ZHU LU WU.

Os resultados aqui demonstrados perceberam-se que a PC12 sem o tratamento manteve sua característica poligonal. A presença do LPS causou uma alteração sutil, representado por protuberância da célula retraída e arredondada. O mesmo comportamento foi verificado em um estudo utilizando LPS e células PC12 (ZHAO et al., 2023a). Já na presença do BIS, as características permaneceram similares ao controle. No mesmo estudo verificou-se que a quetamina em baixas doses foi capaz de melhorar a morfologia celular em comparação com o grupo LPS.

Os astrócitos representam as células mais abundantes no cérebro dos mamíferos. Além disso, eles apresentam morfologia heterogênea, no qual varia em quantidade de corpos celulares além do formato. Essa diversidade morfológica ainda não é completamente compreendida, entretanto, é importante mencionar que eles apresentam rapidez na remodelação estrutural quando são expostos às lesões. Essa característica é interessante visto que no presente trabalho pode-se verificar que ao tratar os astrócitos com o BIS, eles apresentaram características semelhantes com a do controle (MOLOFSKY et al., 2012; ZHOU; ZUO; JIANG, 2019).

XINGI et al., (2023) verificaram a alteração morfológica de astrócitos na presença do LPS, demonstrando aumento no volume dos corpos celulares, representando ativação astrocitária, corroborando com o presente trabalho que verificou lesão da célula na presença do LPS. Outro estudo mostrou que um terpeno, denominado Lupeol, foi capaz de modular a morfologia dos astrócitos, após o dano com o LPS, corroborando com o efeito do BIS (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2019).

A predição de alvos moleculares *in silico* tem permitido o aprofundamento do estudo de diversas substâncias de caráter terapêutico. A fim de determinar o mecanismo de ação para, então, explorar as funções biológicas, muitos fármacos são desenvolvidos com direcionamento e especificidade, sendo relevante para o tratamento de diversas doenças. Os efeitos do (-)- $\alpha$ -bisabolol já são bem descritos na literatura, entretanto, ainda é necessário elucidar alguns mecanismos pelos quais ele age, como por exemplo, seu potencial anti-inflamatório.



O presente trabalho explorou três possíveis alvos pelo qual o BIS poderia ligar-se: o receptor *Toll-like 4* (TLR4), a enzima fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e a enzima hemeoxigenase (HMOX). Entende-se como uma ligação eficaz, quando a energia de ligação é superior a 6, e o RMSD é inferior a 2. Além disso, configura-se que apesar de haver várias interações moleculares, a ligação de hidrogênio configura estabilidade na ligação entre ligante-receptor (KAMAL; CHAKRABARTI, 2023).

O BIS demonstrou que é estabilizado pelas interações da ligação de hidrogênio com GLU254 em TLR4, com ILE65 em PI3K e TRP355 em HMOX. Nagore et al., (2023) analisaram o *docking molecular* do BIS, e verificaram a estabilidade pelas interações de ligação de hidrogênio com HIS207, GLN203, HEM (complexo anti-inflamatório) e GLU16 (análise antioxidante).

Apesar da estabilidade nos três receptores avaliados, verifica-se que o BIS apresenta maior energia de ligação com HMOX. Estudos relacionados com neuroinflamação e depressão demonstraram o aumento da expressão da heme-oxigenase como bioindicador de melhora nos sintomas depressivos-símiles em roedores (EL-SAYED et al., 2023; ZHAO et al., 2023b). O presente trabalho aponta que o efeito anti-inflamatório do BIS favorece o efeito antidepressivo e neuroprotetor no modelo estudado, além de que alvos como HMOX pode estar envolvido nesse processo e sugere uma futura abordagem para elucidação do mecanismo molecular de seu efeito terapêutico.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o  $\alpha$ -bisabolol possui efeito neuroprotetor em células PC12 e astrócitos expostos ao estímulo com o LPS, além de reverter sintomas do tipo depressivo e ansioso-símile, e de reduzir danos relacionado à memória de curto prazo em camundongos expostos durante 10 dias com LPS. O efeito do BIS está relacionado ao seu efeito anti-inflamatório em reduzir citocinas pró-inflamatórias, antioxidante ao proteger às células contra ERO e conseqüentemente, mantendo o potencial transmembrânico mitocondrial, além de atuar protegendo da morte celular. Foi demonstrado, através do *screening* virtual, que TLR4, HMOX e PI3K podem estar envolvidos com o mecanismo de ação no efeito antidepressivo do  $\alpha$ -bisabolol. Tais achados permitem evidenciar o potencial do BIS em distúrbios neuropsiquiátricos que envolvam os alvos aqui mencionados.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI-MALEKI, S. et al. Antidepressant Potential of *Ferula gummosa* Essential Oil in Mouse Models. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 10, n. 3, jul. 2023.
- ADEOLUWA, O. A. et al. Quercetin abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like symptoms by inhibiting neuroinflammation via microglial NLRP3/NF $\kappa$ B/iNOS signaling pathway. **Behavioural Brain Research**, v. 450, p. 114503, jul. 2023.
- AKTER, A. et al. CNS depressant activities of *Averrhoa carambola* leaves extract in thiopental-sodium model of Swiss albino mice: implication for neuro-modulatory properties. **Biologia**, v. 77, n. 5, p. 1337–1346, maio 2022.
- ALACEVICH, C. et al. Depression and anxiety during and after episodes of COVID-19 in the community. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 8257, 22 maio 2023.
- ALAM, Q.; KRISHNAMURTHY, S. Dihydroquercetin ameliorates LPS-induced neuroinflammation and memory deficit. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, v. 3, p. 100091, 2022.
- AL-AMIN, MD. M. et al. Pretreatment With Risperidone Ameliorates Systemic LPS-Induced Oxidative Stress in the Cortex and Hippocampus. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 384, 8 jun. 2018.
- ALI ESMAIL AL-SNAFI; LAWAHIDH FALI HASHAM. Bioactive constituents and pharmacological importance of *Matricaria chamomilla*: A recent review. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 2, p. 079–098, 28 fev. 2023.
- ARANDA, A. et al. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 954–963, mar. 2013.
- ARUNACHALAM, S. et al.  $\alpha$ -Bisabolol Attenuates Doxorubicin Induced Renal Toxicity by Modulating NF- $\kappa$ B/MAPK Signaling and Caspase-Dependent Apoptosis in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10528, 10 set. 2022a.
- ARUNACHALAM, S. et al.  $\alpha$ -Bisabolol Attenuates NF- $\kappa$ B/MAPK Signaling Activation and ER-Stress-Mediated Apoptosis by Invoking Nrf2-Mediated Antioxidant Defense Systems against Doxorubicin-Induced Testicular Toxicity in Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 21, p. 4648, 3 nov. 2022b.
- AZIZI, Z. et al. Neuroprotective effects of carvacrol against Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: A review. v. 12, n. 4, 2022.
- BAI, Y. et al. S100A1 expression is increased in spinal cord injury and promotes inflammation, oxidative stress and apoptosis of PC12 cells induced by LPS via ERK signaling. **Molecular Medicine Reports**, v. 27, n. 2, p. 30, 13 dez. 2022.
- BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 234–256, jul. 2020.

- BHATT, S. et al. Targeting inflammation: a potential approach for the treatment of depression. **Metabolic Brain Disease**, v. 38, n. 1, p. 45–59, jan. 2023.
- BLACK, C. N. et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–175, jan. 2015.
- BROWN, G. C.; CAMACHO, M.; WILLIAMS-GRAY, C. H. The Endotoxin Hypothesis of Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 38, n. 7, p. 1143–1155, jul. 2023.
- BRYANT, C. E. et al. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 8–14, jan. 2010.
- CAVALCANTE, H. A. O. et al. Effect of (-)- $\alpha$ -Bisabolol on the Inflammatory Response in Systemic Infection Experimental Model in C57BL/6 Mice. **Inflammation**, v. 43, n. 1, p. 193–203, fev. 2020.
- CHAKRAPANI, S. et al. Neuroplasticity and the Biological Role of Brain Derived Neurotrophic Factor in the Pathophysiology and Management of Depression. **Cureus**, 9 nov. 2020.
- CHEN, L. et al. Three methods of behavioural testing to measure anxiety – A review. **Behavioural Processes**, v. 215, p. 104997, fev. 2024.
- CHEN, P.; YAO, H.; HUANG, L. J. Cytokine Receptor Endocytosis: New Kinase Activity-Dependent and -Independent Roles of PI3K. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 78, 1 maio 2017.
- CHEN, Y. et al. Lipopolysaccharide-induced endotoxaemia during adolescence promotes stress vulnerability in adult mice via deregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the medial prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 240, n. 4, p. 713–724, abr. 2023.
- CHIHANGA, T. et al. NMR spectroscopy and electron microscopy identification of metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 314, n. 2, p. F154–F166, 1 fev. 2018.
- Cinnametin Inhibits the Induction of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines in Macrophages, Microglia and Astrocytes. **Journal of Clinical & Experimental Immunology**, v. 8, n. 1, 31 jan. 2023.
- CORREIA, A. S.; CARDOSO, A.; VALE, N. Oxidative Stress in Depression: The Link with the Stress Response, Neuroinflammation, Serotonin, Neurogenesis and Synaptic Plasticity. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 470, 13 fev. 2023.
- CUSKELLY, A. et al. Neonatal immune challenge influences the microbiota and behaviour in a sexually dimorphic manner. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 103, p. 232–242, jul. 2022.
- DE CICCO, P. et al. Chamomile essential oils exert anti-inflammatory effects involving human and murine macrophages: Evidence to support a therapeutic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 311, p. 116391, jul. 2023.

DECANDIA, D. et al. Dietary Protection against Cognitive Impairment, Neuroinflammation and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Animal Models of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5921, 21 mar. 2023.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, maio 1986.

DOS SANTOS, R. A. L. et al. Guanosine treatment prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 164, p. 296–303, ago. 2023.

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

EDDIN, L. B. et al. Health Benefits, Pharmacological Effects, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Potential of  $\alpha$ -Bisabolol. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1370, 25 mar. 2022.

EL-SAYED, R. M. et al. Neuroprotection impact of biochanin A against pentylene-tetrazol-kindled mice: Targeting NLRP3 inflammasome/TXNIP pathway and autophagy modulation. **International Immunopharmacology**, v. 115, p. 109711, fev. 2023.

FANG, K. et al. Quercetin Alleviates LPS-Induced Depression-Like Behavior in Rats via Regulating BDNF-Related Imbalance of Copine 6 and TREM1/2 in the Hippocampus and PFC. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1544, 17 jan. 2020.

FAWZI, S. F. et al. Clotrimazole ameliorates chronic mild stress-induced depressive-like behavior in rats; crosstalk between the HPA, NLRP3 inflammasome, and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways. **International Immunopharmacology**, v. 127, p. 111354, jan. 2024.

FERNANDES, M. Y. D. et al. (-)- $\alpha$ -bisabolol prevents neuronal damage and memory deficits through reduction of proinflammatory markers induced by permanent focal cerebral ischemia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 842, p. 270–280, jan. 2019.

FILE, S. E.; WARDILL, A. G. The reliability of the hole-board apparatus. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 47–51, 1975.

FLEISHER-BERKOVICH, S. et al. Therapeutic Potential of Phytocannabinoid Cannabigerol for Multiple Sclerosis: Modulation of Microglial Activation In Vitro and In Vivo. **Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 376, 16 fev. 2023.

FRENOIS, F. et al. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516–531, jun. 2007.

GUO, B. et al. Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression. **Translational Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 5, 9 jan. 2023.

HEALEY, K. et al. Adolescent intermittent ethanol exposure alters adult exploratory and affective behaviors, and cerebellar Grin2b expression in C57BL/6J mice. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 253, p. 111026, dez. 2023.

HERRERA-ISAZA, L. et al. Role of environmental enrichment on social interaction, anxiety, locomotion, and memory in Wistar rats under chronic methylphenidate intake. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 17, p. 1251144, 14 nov. 2023.

HUANG, X.; HUSSAIN, B.; CHANG, J. Peripheral inflammation and blood–brain barrier disruption: effects and mechanisms. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 36–47, jan. 2021.

HUFFSTETLER, C. M. et al. Single cannabidiol administration affects anxiety-, obsessive compulsive-, object memory-, and attention-like behaviors in mice in a sex and concentration dependent manner. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 222, p. 173498, jan. 2023.

JAVED, H. et al.  $\alpha$ -Bisabolol, a Dietary Bioactive Phytochemical Attenuates Dopaminergic Neurodegeneration through Modulation of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Apoptosis in Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1421, 8 out. 2020.

JEYAKUMAR, M. et al.  $\alpha$ -bisabolol  $\beta$ -D-fucopyranoside as a potential modulator of  $\beta$ -amyloid peptide induced neurotoxicity: An in vitro & in silico study. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102935, jul. 2019.

JOHNSTON, J. N. et al. Inflammation, stress and depression: An exploration of ketamine's therapeutic profile. **Drug Discovery Today**, v. 28, n. 4, p. 103518, abr. 2023.

KALYAN, M. et al. Role of Endogenous Lipopolysaccharides in Neurological Disorders. **Cells**, v. 11, n. 24, p. 4038, 14 dez. 2022.

KAMAL, I. M.; CHAKRABARTI, S. MetaDOCK: A Combinatorial Molecular Docking Approach. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5850–5860, 14 fev. 2023.

KIM, S. et al. Facile Fabrication of  $\alpha$ -Bisabolol Nanoparticles with Improved Antioxidant and Antibacterial Effects. **Antioxidants**, v. 12, n. 1, p. 207, 16 jan. 2023.

KIRICHENKO, T. V. et al. **Pro-inflammatory response of monocytes in systemic sclerosis**. [s.l.] In Review, 8 jun. 2023. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-3025005/v1>>. Acesso em: 7 set. 2023.

KONG, C. H. et al. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on depression-like behaviors induced by maternal separation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 956, p. 175954, out. 2023.

KOYAMA, S.; HEINBOCKEL, T. The Effects of Essential Oils and Terpenes in Relation to Their Routes of Intake and Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1558, 25 fev. 2020.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. Em: GUEST, P. C. (Ed.). **Pre-Clinical Models**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2019. v. 1916p. 105–111.

LAKHAN, R.; AGRAWAL, A.; SHARMA, M. Prevalence of Depression, Anxiety, and Stress during COVID-19 Pandemic. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 11, p. 519–525, 11 set. 2020.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 91–104, jan. 2002.

LEONARD, B. E. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? **Acta Neuropsychiatrica**, v. 30, n. 1, p. 1–16, fev. 2018.

LI, A. et al. Roxadustat (FG-4592) abated lipopolysaccharides-induced depressive-like symptoms via PI3K signaling. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, p. 1048985, 15 mar. 2023a.

LI, T. et al. Blocking osteopontin expression attenuates neuroinflammation and mitigates LPS-induced depressive-like behavior in mice. **Journal of Affective Disorders**, v. 330, p. 83–93, jun. 2023b.

LISTER, RICHARDG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, jun. 1987.

LITKE, R. et al. **Novel compound inhibits glycolysis, proteotoxicity, inflammation, and impairments in animal models of Alzheimer's, Huntington's, and stroke: Aging as a consequence of glycolysis.** [s.l.] Neuroscience, 13 jun. 2023. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.06.12.544352>>. Acesso em: 7 set. 2023.

LIU, J. et al. Piceatannol Protects PC-12 Cells against Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction by Inhibiting Autophagy via SIRT3 Pathway. **Nutrients**, v. 15, n. 13, p. 2973, 30 jun. 2023.

LORIGOOINI, Z. et al. Limonene through Attenuation of Neuroinflammation and Nitrite Level Exerts Antidepressant-Like Effect on Mouse Model of Maternal Separation Stress. **Behavioural Neurology**, v. 2021, p. 1–8, 29 jan. 2021.

LU, X. et al. Engineered exosomes enriched in netrin-1 modRNA promote axonal growth in spinal cord injury by attenuating inflammation and pyroptosis. **Biomaterials Research**, v. 27, n. 1, p. 3, 17 jan. 2023.

LU, Y.-C.; YEH, W.-C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, maio 2008.

MADESWARAN, A.; MOHAN, S. Neuroprotective effects of terpenoids against streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats: An in silico, in vitro and in vivo study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 247, p. 125817, ago. 2023.

MEERAN, M. F. N. et al. Protective effects of  $\alpha$ -bisabolol on altered hemodynamics, lipid peroxidation, and nonenzymatic antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction: In vivo and in vitro evidences: MEERAN ET AL. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 10, p. e22200, out. 2018.

MOLOFSKY, A. V. et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. **Genes & Development**, v. 26, n. 9, p. 891–907, 1 maio 2012.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MURRAY, E. et al. Probiotic consumption during puberty mitigates LPS-induced immune responses and protects against stress-induced depression- and anxiety-like behaviors in adulthood in a sex-specific manner. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 81, p. 198–212, out. 2019.

NADI, A. et al. Thymus vulgaris, a natural pharmacy against COVID-19: A molecular review. **Journal of Herbal Medicine**, v. 38, p. 100635, mar. 2023.

NAGOOR MEERAN, M. F. et al.  $\alpha$ -Bisabolol abrogates isoproterenol-induced myocardial infarction by inhibiting mitochondrial dysfunction and intrinsic pathway of apoptosis in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 453, n. 1–2, p. 89–102, mar. 2019.

NAGOOR MEERAN, M. F. et al.  $\alpha$ -Bisabolol, a Dietary Sesquiterpene, Attenuates Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity in Rats by Inhibiting Cellular Signaling Pathways, Nrf2/Keap-1/HO-1, Akt/mTOR/GSK-3 $\beta$ , NF- $\kappa$ B/p38/MAPK, and NLRP3 Inflammasomes Regulating Oxidative Stress and Inflammatory Cascades. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14013, 13 set. 2023.

NAGORE, P.; LOKHANDE, P.; MUJAWAR, H. In-vitro Bioevaluation, Pharmacokinetics and Molecular Docking Study of unexplored Bisabolol-rich Curcuma inodora essential oil from Konkan region: A biodiversity hotspot. **Plant Science Today**, 14 jan. 2023.

OLIVEIRA-JUNIOR, M. S. et al. Lupeol inhibits LPS-induced neuroinflammation in cerebellar cultures and induces neuroprotection associated to the modulation of astrocyte response and expression of neurotrophic and inflammatory factors. **International Immunopharmacology**, v. 70, p. 302–312, maio 2019.

OMACHI, T.; MATSUYAMA, N.; HASEGAWA, Y. Nacre extract from pearl oyster suppresses LPS-induced depression and anxiety. **Journal of Functional Foods**, v. 100, p. 105373, jan. 2023.

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

POKORNÝ, J. et al. Targeting Mitochondria for Cancer Treatment – Two Types of Mitochondrial Dysfunction. **Prague Medical Report**, v. 115, n. 3–4, p. 104–119, 2014.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, fev. 1978.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, jun. 2002.



- RAMAZANI, E. et al. Pharmacological and biological effects of alpha-bisabolol: An updated review of the molecular mechanisms. **Life Sciences**, v. 304, p. 120728, set. 2022.
- ROCHA, D. D. et al. Cell cycle arrest through inhibition of tubulin polymerization by withaphysalin F, a bioactive compound isolated from *Acnistus arborescens*. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 3, p. 959–966, jun. 2012.
- ROJAS-CARVAJAL, M.; BRENES, J. C. Acute stress differentially affects grooming subtypes and ultrasonic vocalisations in the open-field and home-cage test in rats. **Behavioural Processes**, v. 176, p. 104140, jul. 2020.
- SALMANI, H. et al. Carvacrol attenuated neuroinflammation, oxidative stress and depression and anxiety like behaviors in lipopolysaccharide-challenged rats. v. 12, n. 5, 2022.
- SAMPAIO, T. L. et al. Nephroprotective effects of (–)- $\alpha$ -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1843–1852, dez. 2016.
- SAMPAIO, T. L. et al. Involvement of NADPH-oxidase enzyme in the nephroprotective effect of (–)- $\alpha$ -bisabolol on HK2 cells exposed to ischemia – Reoxygenation. **European Journal of Pharmacology**, v. 855, p. 1–9, jul. 2019.
- SATHYA, S.; SHANMUGANATHAN, B.; DEVI, K. P. Deciphering the anti-apoptotic potential of  $\alpha$ -bisabolol loaded solid lipid nanoparticles against A $\beta$  induced neurotoxicity in Neuro-2a cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 190, p. 110948, jun. 2020.
- SHANMUGANATHAN, B. et al. Amyloid- $\beta$  induced neuropathological actions are suppressed by *Padina gymnospora* (Phaeophyceae) and its active constituent  $\alpha$ -bisabolol in Neuro2a cells and transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's model. **Nitric Oxide**, v. 91, p. 52–66, out. 2019.
- SHI, Y. et al. Protection of Taohong Siwu Decoction on PC12 cells injured by oxygen glucose deprivation/reperfusion via mitophagy-NLRP3 inflammasome pathway in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 301, p. 115784, jan. 2023.
- SOCHOCKA, M.; DINIZ, B. S.; LESZEK, J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8071–8089, dez. 2017.
- SOUZA, E. R. L. D. et al. Propriedades farmacológicas do Sesquiterpeno  $\alpha$  - Bisabolol: uma breve revisão. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 10, n. 1, p. 18–23, 11 abr. 2020.
- SRIVASTAVA, J. K.; GUPTA, S. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Chamomile Extract in Various Human Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9470–9478, 1 nov. 2007.
- TAI, Y. et al. Biosynthesis of  $\alpha$ -Bisabolol by Farnesyl Diphosphate Synthase and  $\alpha$ -Bisabolol Synthase and Their Related Transcription Factors in *Matricaria recutita* L. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1730, 15 jan. 2023.
- TAO, L. et al. GRK6 palmitoylation increasing its membrane translocation promotes LPS-induced inflammation by PI3K/ AKT pathway in kuppfer cells. **International Immunopharmacology**, v. 117, p. 109933, abr. 2023.

USHIO, S. et al. Anxiolytic-like effects of hochuekkito in lipopolysaccharide-treated mice involve interleukin-6 inhibition. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 890048, 12 ago. 2022.

VIEIRA, G. et al. Antidepressant-Like Effect of Terpineol in an Inflammatory Model of Depression: Involvement of the Cannabinoid System and D2 Dopamine Receptor. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 792, 20 maio 2020.

WENG, J. et al. Glabridin reduces neuroinflammation by modulating inflammatory signals in LPS-induced in vitro and in vivo models. **Inflammopharmacology**, 19 fev. 2024.

WESTON-GREEN, K.; CLUNAS, H.; JIMENEZ NARANJO, C. A Review of the Potential Use of Pinene and Linalool as Terpene-Based Medicines for Brain Health: Discovering Novel Therapeutics in the Flavours and Fragrances of Cannabis. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, p. 583211, 26 ago. 2021.

WU, X. et al. Reduced inhibition underlies early life LPS exposure induced-cognitive impairment: Prevention by environmental enrichment. **International Immunopharmacology**, v. 108, p. 108724, jul. 2022.

WU, X. et al. Heme oxygenase-1 ameliorates endotoxin-induced acute lung injury by modulating macrophage polarization via inhibiting TXNIP/NLRP3 inflammasome activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 194, p. 12–22, jan. 2023a.

WU, X. et al. Electroacupuncture attenuates LPS-induced depression-like behavior through kynurenine pathway. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 16, p. 1052032, 10 jan. 2023b.

WU, Y. et al. Overexpression of FSP1 Ameliorates ferroptosis via PI3K/ AKT /GSK3 $\beta$  pathway in PC12 cells with Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation. **Heliyon**, v. 9, n. 8, p. e18449, ago. 2023c.

XIE, X. et al. Hyper-inflammation of astrocytes in patients of major depressive disorder: Evidence from serum astrocyte-derived extracellular vesicles. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 109, p. 51–62, mar. 2023.

XINGI, E. et al. LPS-Induced Systemic Inflammation Affects the Dynamic Interactions of Astrocytes and Microglia with the Vasculature of the Mouse Brain Cortex. **Cells**, v. 12, n. 10, p. 1418, 17 maio 2023.

ZHANG, J. et al. (R)-Ketamine attenuates LPS-induced endotoxin-derived delirium through inhibition of neuroinflammation. **Psychopharmacology**, v. 238, n. 10, p. 2743–2753, out. 2021.

ZHAO, J. et al. Low-dose ketamine inhibits neuronal apoptosis and neuroinflammation in PC12 cells via  $\alpha$ 7nAChR mediated TLR4/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 117, p. 109880, abr. 2023a.

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

ZHAO, Y. et al. Verbascoside: A neuroprotective phenylethanoid glycosides with anti-depressive properties. **Phytomedicine**, v. 120, p. 155027, nov. 2023b.

ZHOU, B.; ZUO, Y.; JIANG, R. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 665–673, jun. 2019.

ZHU, N. et al. Neuroprotective Actions of Different Exogenous Nucleotides in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Cell Death in PC-12 Cells. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1226, 26 jan. 2023.

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO ALFA-BISABOLOL EM UM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO: NOVAS PERSPECTIVAS NA ABORDAGEM DO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO PELA VIA INFLAMATÓRIA.", protocolada sob o CEUA nº 3228090320 (ID 001552), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa e equipe; Manoela de Oliveira Rebouças** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 08/04/2020.

We certify that the proposal "IN VITRO AND IN VIVO INVESTIGATION OF THE PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF ALPHA-BISABOLOL IN A MODEL OF NEUROINFLAMATION: NEW PERSPECTIVES IN THE APPROACH TO THE TREATMENT OF DEPRESSION BY THE INFLAMMATORY PATHWAY.", utilizing 248 Isogenics mice (248 males), protocol number CEUA 3228090320 (ID 001552), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa and team; Manoela de Oliveira Rebouças** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/08/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 05/2020 a 01/2022 Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 42 a 48 dias

Quantidade: 248

Linhagem: C57BL/6

Peso: 22 a 29 g

Fortaleza, 19 de janeiro de 2024

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira  
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

