



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

VICTOR CELSO CAVALCANTI CAPIBARIBE

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS ANTIDEPRESSIVO E
CITOPROTETOR DA RIPARINA IV EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO
INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI***

FORTALEZA - CE
2024

VICTOR CELSO CAVALCANTI CAPIBARIBE

AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS ANTIDEPRESSIVO E
CITOPROTETOR DA RIPARINA IV EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO
INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI*

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 doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

Fortaleza - CE
2024

VICTOR CELSO CAVALCANTI CAPIBARIBE

AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS ANTIDEPRESSIVO E
CITOPROTETOR DA RIPARINA IV EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO
INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI*

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 doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 30/07/2024

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Morais
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Expedito Rogildo Cordeiro Carlos
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof. Dr. Flavio Nogueira da Costa
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

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)

- C242a Capibaribe, Victor Celso Cavalcanti.
Avaliação in vivo e in vitro dos efeitos antidepressivo e citoprotetor da riparina iv em modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo de escherichia coli / Victor Celso Cavalcanti Capibaribe. – 2024.
79 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
1. Neuroinflamação. 2. Riparina IV. 3. Depressão. 4. Astrócito. I. Título.

CDD 615.1

À Glória do Grande Arquiteto do Universo.
Aos meus pais, Tereza e Celso e a toda minha família.

"Tell me now
Just tell me what you see
If you believe in miracles and dreams
You can make it real!"

Dr. Sin - Miracles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de poder pesquisar, produzir e finalizar este trabalho. Agradeço a Ele por todas as noites em claro, todas as renúncias e todas as dificuldades que encontrei, pois ao final, tudo valeu a pena. Ele sempre soube o que era melhor pra mim. À Glória do Grande Arquiteto do Universo.

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial à minha mãe. Um exemplo de mulher, de mãe e de ser humano. Ela nunca soltou a minha mão em nenhum momento e sempre me guiou pelos melhores caminhos. Dedico, também, ao meu pai, ele que tem me acompanhado lá de cima todos os meus passos, pesando minha consciência quando necessário e me ajudando sempre a caminhar em frente. Não seria quem eu sou se não fosse o sr., papai. De onde o sr estiver saiba que sinto muito a sua falta e que o sr. é muito importante para mim. Amo muito vocês dois. Para mamãe e papai, com amor.

Dedico, também, aos meus irmãos, Milena e Almir. Por todos os conselhos e por terem me apoiado sempre. Agradeço a Deus pela família maravilhosa que tenho, pois sorte maior no mundo não há. Não poderia deixar de agradecer também aos meus cunhados, Adriano e Laís por toda companhia, risos e apoio que me foram dados. Aos meus sobrinhos Anderson, Anna Clara, Anna Carolina e Amanda, por todos os sorrisos e sentimento de orgulho que vocês têm de mim. Amo todos vocês.

A minha princesa, Bia. Esse trabalho não seria possível se não fossem todas as suas palavras de apoio, todo o seu amor confiado a mim e todas as vezes que você me faz lembrar o quão bom é a vida com você. Que possamos viver juntos por longos anos e que a nossa vida seja repleta deste sentimento diários que cultivamos. *With Love to my Lobster!*

Agradeço a todos os meus companheiros de laboratório, em especial a minha orientadora Profa. Cléa Florenço e ao Prof. Tiago Sampaio. Sem suas orientações e confiança este trabalho não poderia ser feito. Agradeço, também, a Manoela, Larice, Daniel, Sheila, Iardja, Mac, Bell, Ketsya, Letícia, Guenda e a todos os pesquisadores que participaram do trabalho e fazem parte dos laboratórios da UFC. Seria uma página apenas com os nomes de todos os que me ajudaram de alguma forma. Saibam que sou muito grato a cada um de vocês.

Agradeço, também, a equipe do Biotério Prof. Eduardo Torres, por todo o apoio. Deixo registrado meu agradecimento ao Wesley, Gabi e Augusto que muito me ajudaram e auxiliaram em vários momentos desta pesquisa. Agradeço a Alanna, Dani e Haroldo por toda compreensão, ajuda e por sempre acreditarem que eu chegaria lá. Este dia chegou e vocês fizeram parte dessa história! Muito obrigado!

Agradeço a Profa. Arlandia, Prof. Rogildo e Prof. Flávio, não só por me guiarem na graduação em farmácia, mas também pela presença na minha caminhada tanto no meu mestrado como do meu doutorado. Vocês me conduziram até aqui e espero deixá-los orgulhosos como aluno egresso. Saibam que todos os ensinamentos que vocês me passaram foram cruciais para a minha formação. Vocês realizam sonhos e realizaram os meus, saibam disso! Muito obrigado!

Por fim, agradeço à CAPES e ao CNPQ por todo o apoio financeiro.

Muito obrigado!

RESUMO

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns e recorrentes, podendo debilitar de forma grave o paciente. É clinicamente caracterizada por humor deprimido e prolongado, podendo ser acompanhada de baixa autoestima, dor, distúrbios do sono ou do apetite e ideias suicidas. Evidências sugerem um papel importante da neuroinflamação na etiologia e progressão deste transtorno, e neste contexto, os astrócitos desempenham uma função fundamental. Estas células possuem receptores Toll-Like Receptor 4 (TLR4) que quando sensibilizados ao Lipopolissacarídeo (LPS) desencadeiam uma cascata inflamatória com auxílio da proteína MD-2, levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias resultando em um quadro neuroinflamatório. Considerando a importância da busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento da depressão, este trabalho investiga o papel da Riparina IV (RIP IV), substância que já demonstrou possuir diversas atividades, dentre elas anti-inflamatória e antidepressiva em modelos animais. O presente trabalho tem por objetivo avaliar os possíveis efeitos da RIP IV na depressão frente a cascata neuroinflamatória desencadeada pelo LPS em animais, utilizando como alvo o complexo TLR4/MD-2. Os experimentos foram conduzidos em camundongos machos da linhagem C57BL/6 submetidos à administração sistêmica de LPS (0,5mg/kg) durante 10 dias, e tratados a partir do 5º dia com RIP IV (50mg/kg), salina (0,9%), escitalopram (10mg/kg). Testes *in silico* (dockagem molecular), *in vivo* (comportamentais) e *in vitro* (viabilidade celular e citotoxicidade) com astrócitos foram executados. Os resultados mostram que RIP IV apresentou afinidade de encaixe na porção MD-2, semelhante ao antagonista Eritoran (ERI), indicando uma possível ligação entre ela e o complexo MD-2. A RIP IV mostrou atividade antidepressiva similar nos testes do nado forçado, preferência pela sacarose e splash e atividade ansiolítica no teste do *plus maze* e campo aberto nos animais previamente submetidos ao tratamento com LPS. Não foram observadas alterações relevantes nos testes da placa perfurada, e *y maze*. Nos testes *in vitro*, foram feitos estudos de citotoxicidade da RIP IV, sendo selecionadas três concentrações após o teste do MTT: 15,62µM, 7,81µM e 3,90µM. Na avaliação da morte celular, foi evidente o processo necrótico causado pelo LPS e o efeito citoprotetor da RIP IV. Com base nos efeitos citoprotetor e antidepressivo-símile demonstrado além da possibilidade de encaixe semelhante com um antagonista MD-2, a RIP IV parece ser uma molécula relevante e estudos futuros podem culminar na disponibilidade de uma nova alternativa terapêutica para o transtorno depressivo maior.

Palavras-chave: Neuroinflamação; Riparina IV; Depressão; Astrócito.

ABSTRACT

***In Vivo and In Vitro* Evaluation of the Antidepressant and Cytoprotective Effects of Riparin IV in a Neuroinflammation Model Induced by *Escherichia Coli* Lipopolysaccharide.**

Depression is one of the most common and recurrent psychiatric disorders, potentially severely debilitating for patients. It is clinically characterized by prolonged depressed mood, often accompanied by low self-esteem, pain, sleep or appetite disturbances, and suicidal ideation. Evidence suggests a significant role of neuroinflammation in the etiology and progression of this disorder, with astrocytes playing a fundamental role in this context. These cells possess Toll-Like Receptor 4 (TLR4) which, when sensitized to Lipopolysaccharide (LPS), trigger an inflammatory cascade with the aid of the MD-2 protein, leading to the release of pro-inflammatory cytokines resulting in a neuroinflammatory state. Considering the importance of seeking new therapeutic targets for depression treatment, this study investigates the role of riparin IV (RIP IV), a substance previously demonstrated to possess various activities, including anti-inflammatory and antidepressant effects in animal models. The objective of this work is to evaluate the potential effects of RIP IV on depression in the context of the neuroinflammatory cascade triggered by LPS in animals, targeting the TLR4/MD-2 complex. Experiments were conducted on male C57BL/6 mice subjected to systemic administration of LPS (0.5mg/kg) for 10 days, and treated from the 5th day with RIP IV (50mg/kg), saline (0.9%), and escitalopram (10mg/kg). *In silico* (molecular docking), *in vivo* (behavioral), and *in vitro* (cell viability and cytotoxicity) tests with astrocytes were performed. The results show that RIP IV demonstrated binding affinity to the MD-2 portion similar to the antagonist ERI, indicating a possible interaction with the MD-2 complex. RIP IV exhibited antidepressant-like activity in the forced swim test, sucrose preference test, and splash test, as well as anxiolytic activity in the elevated plus maze and open field test in animals previously treated with LPS. No significant changes were observed in the hole-board and Y-maze tests. *In vitro* tests showed RIP IV cytotoxicity studies, with three concentrations selected after the MTT assay: 15.62, 7.81, and 3.90 μ M. Evaluation of cell death revealed the necrotic process caused by LPS and the cytoprotective effect of RIP IV. Based on the demonstrated cytoprotective and antidepressant-like effects, as well as the potential similar binding with an MD-2 antagonist, RIP IV appears to be a relevant molecule, and future studies may culminate in the availability of a new therapeutic alternative for major depressive disorder. **Keywords:** Neuroinflammation; Riparin IV; Depression; Astrocyte.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cascata de ativação do TLR4 pelo LPS.	23
Figura 2 - Estrutura molecular da Tiramina.	24
Figura 3 - Estruturas moleculares das Riparinas I, II, III e IV.	24
Figura 4 - Delineamento experimental animal.	34
Figura 5 - Delineamento experimental comportamental dos animais.	34
Figura 6 - Teste do Nado Forçado.	35
Figura 7 - Cálculo e Teste da Preferência pela Sacarose.	36
Figura 8 - Teste do Splash.	37
Figura 9 - Teste do Campo Aberto.	38
Figura 10 - Cálculo e Teste do Plus Maze.	39
Figura 11 - Teste da Placa Perfurada.	40
Figura 12 - Teste do Y-Maze.	41
Figura 13 – Região de ancoragem da melhor pose da Riparina IV na proteína-alvo.	42
Figura 14 – Região de ancoragem da melhor pose do Lipídio X na proteína-alvo.	42
Figura 15 – Região de ancoragem da melhor pose do Eritoran na proteína-alvo.	43
Figura 16 – Mapa 2D das interações entre a Riparina IV e o TLR4/MD-2.	47
Figura 17 - Avaliação da viabilidade celular da Riparina IV em Astrócitos murinos após 24h de incubação.	48
Figura 18 – Índices de morte celular causada pelo Lipopolissacarídeo e revertido pela Riparina IV em Astrócitos nas concentrações de 15,62 μ M, 7,81 μ M e 3,90 μ M respectivamente, através da marcação com 7-AAD e ANX.	49
Figura 19 – Gráficos density plot representativos da densidade comparativa da avaliação de morte celular.	50
Figura 20 - Efeito da Riparina IV sobre o tempo de imobilidade de animais.	52
Figura 21 - Efeito da Riparina IV frente o consumo de sacarose em animais.	53
Figura 22 - Efeito da Riparina IV frente ao número, duração e latência dos groomings realizados por animais.	54
Figura 23 - Efeito da Riparina IV frente ao número de cruzamentos, groomings e rearings.	55
Figura 24 - Efeito da Riparina IV frente ao PTBA e PEBA.	56

Figura 25 - Efeito da Riparina IV em relação ao número de "head-dips" . 57

Figura 26 - Efeito da Riparina IV em relação ao número de alternâncias realizadas pelos animais submetidos ao modelo de LPS avaliados pelo teste do Y-Maze. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Energia de afinidade e RMSD da melhor pose de cada ligante.....	43
Tabela 2 - Resultados dos testes in silico.....	44

LISTA DE ABREVIACÕES

7-AAD – 7-amino-actinomicina D
Å - Angstroms
ANX - Anexina V FITC;
AST - Astrócito;
BDNF - Brain-derived Neurotrophic Factor
CT - Controle;
DAMPs - padrões moleculares associados a danos
DMSO - Dimetilsulfóxido
ERI - Eritoran;
ESC - Escitalopram;
EUA - Estados Unidos da América
FDA - Food and Drug Administration
I.P. - Intraperitoneal
IL-12 - Interleucina-12
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-4 - Interleucina-4
IL-6 - Interleucina-6
ISRS - Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
LBP - proteína solúvel de ligação ao LPS
LOS - lipooligossacardeo
LPS - Lipopolissacarídeo;
LPX - Lipídio X
MD-2 - proteína de diferenciação mielóide 2
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- κ B - Fator Nuclear κ B
NGF - fator de crescimento nervoso
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos
PEBA - Percentual de entradas nos braços abertos;
PP - Placa perfurada;

PTBA - Percentual de tempo nos braços abertos;

RIP IV - Riparina IV;

RMSD - Root Mean Square Deviation

SAL - Salina;

SEM - Standard error of the mean

SFB - Soro Fetal Bovino

SNC - Sistema Nervoso Central

TLR4 - *Toll-like receptor 4*

V.O. - Via Oral

μM - Micromolar;

SUMÁRIO

1 Introdução.....	18
1.1 Depressão.....	18
1.2 Etiologia da Depressão.....	19
1.3 Relação entre a Neuroinflamação e Depressão.....	19
1.4 Toll-like Receptor 4.....	21
1.5 Riparina IV.....	23
2 Justificativa.....	25
3 Objetivos.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4 Materiais e Métodos.....	27
4.1 Riparina IV.....	27
4.2 Lipopolissacarídeo.....	28
4.3 Escitalopram.....	28
4.4 Docking Molecular.....	29
4.4.1 Preparação dos ligantes e da proteína-alvo.....	29
4.4.2 Simulação de docking molecular e obtenção dos resultados.....	30
4.5 Testes in vitro.....	30
4.5.1 Manutenção e cultivo celular.....	30
4.5.2 Ensaio de citotoxicidade.....	31
4.5.3 Avaliação do Mecanismo de Morte Celular.....	31
4.5.4 Avaliação da integridade de membrana e exposição da fosfatidilserina.....	32
4.6 Animais.....	32
4.6.1 Delineamento Experimental - Animais.....	33
4.6.2 Testes Comportamentais.....	35
4.6.2.1 Nado Forçado.....	35
4.6.2.2 Teste da Preferência pela Sacarose.....	35
4.6.2.3 Splash.....	36
4.6.2.4 Teste do Campo aberto.....	37
4.6.2.5 Pluz Maze.....	38
4.6.2.6 Teste da Placa Perfurada.....	39
4.6.2.7 Y Maze.....	40

4.7 Análise Estatística.....	41
5 Resultados.....	41
5.1 Testes in silico.....	41
5.1.1 Docking Molecular.....	41
5.2 Testes in vitro.....	47
5.2.1 Ensaio de Viabilidade Celular.....	47
5.2.2 Avaliação do Mecanismo de Morte Celular.....	48
5.3 Testes in vivo.....	51
5.3.1 Testes comportamentais.....	51
5.3.1.1 Nado Forçado.....	51
5.3.1.2 Preferência pela Sacarose.....	52
5.3.1.3 Splash.....	53
5.3.1.4 Campo Aberto.....	55
5.3.1.5 Plus Maze.....	56
5.3.1.6 Placa Perfurada.....	57
5.3.1.7 Y-Maze.....	58
6 Discussão.....	59
7 Conclusão.....	65
8 Referências Bibliográficas.....	66
Anexo 1 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	79

1 Introdução

1.1 Depressão

A depressão é hoje um dos transtornos psiquiátricos mais comuns e recorrentes, podendo debilitar de forma grave o paciente. É clinicamente caracterizada por humor

deprimido e prolongado, podendo ser acompanhada de baixa autoestima, dor, distúrbios do sono ou do apetite e ideias suicidas (Zeng *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2023).

A depressão afeta cerca de 280 milhões de pessoas em todo o mundo, contemplando todas as faixas etárias, sendo este o transtorno psiquiátrico evidenciado com maior frequência. Trata-se de uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo, tendo sido responsável por, aproximadamente, 163.044.100 casos em 2017 (Capibaribe *et al.*, 2019; OMS, 2023; Liu *et al.*, 2024).

O quadro depressivo pode induzir sofrimento, reduzir a produtividade escolar e no trabalho, podendo influenciar negativamente as relações familiares. Quando associada a outras patologias, como doenças cardiovasculares, endócrinas e pulmonares, aumenta os níveis de mortalidade, além do já elevado risco de suicídio (Strothers, 2002; Xie *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2023).

Em contraste com a tristeza, desespero ou a dor experimentada durante a adversidade, a depressão é uma condição de saúde mental. Causa sofrimento profundo e duradouro para o indivíduo, podendo estar associada à morte prematura por doença física e/ou suicídio. Para além do indivíduo, a depressão também afeta famílias e comunidades, prejudicando, de forma expressiva, o funcionamento social e a produtividade econômica (Dwyer *et al.*, 2020; Philipson *et al.*, 2020; Wright *et al.*, 2021; Herrman *et al.*, 2022; Lu; Lin; Su, 2024).

Uma porcentagem de casos tem início na infância, podendo aumentar drasticamente durante a adolescência. A literatura estima que aos 19 anos, 25% dos adolescentes podem ter vivido um episódio depressivo. Os episódios depressivos, na idade pré-adulta, muitas vezes predizem desafios no relacionamento, dificuldades acadêmicas e profissionais, má qualidade de vida, doenças físicas, mentais e possibilidade aumentada de automutilação (Hawrilenko *et al.*, 2021; Hetrick *et al.*, 2021; Morken *et al.*, 2021; Fitzpatrick *et al.*, 2023; Korczak; Westwellroper; Sassi, 2023; Lu *et al.*, 2024).

1.2 Etiologia da Depressão

Várias vias são sugeridas para responder a etiologia depressiva. A disfunção na neurotransmissão monoaminérgica é uma das teorias mais estudadas atualmente, tendo sido utilizada como a base biológica do transtorno depressivo por décadas. Porém, a depressão tem se mostrado plural em relação a sua etiologia, uma vez que estudos mostram que não só a

disfunção monoaminérgica pode estar relacionada com o quadro depressivo, mas o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, o ciclo circadiano e processos neuroimunológicos também parecem estar envolvidos na etiologia depressiva (Mcclung, 2007; Vismari; Alves; Palermo-Neto, 2008; Miller, 2010; Anacker *et al.*, 2011; Prins; Oliver; Korte, 2011; Mulinari, 2012).

A teoria monoaminérgica, por sua vez, vem propor que a depressão seja consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, tendo como foco a serotonina, noradrenalina e/ou dopamina. Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos, que se baseiam, principalmente, no aumento da disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica (Vismari; Alves; Palermo-Neto, 2008; Capibaribe *et al.*, 2019). Porém, vale ressaltar que existem outras vias sendo relacionadas com a depressão. Temos, como exemplo, a via neurogênica, onde a deficiência de neurotrofinas, especialmente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), parece estar relacionada com a depressão. A via neuroinflamatória também vem apresentando destaque, onde têm sido associados células neuronais, citocinas e mecanismos inflamatórios ao quadro depressivo (Wohleb *et al.*, 2018; Zarza-Rebollo *et al.*, 2024; Zhou *et al.*, 2024).

1.3 Relação entre a Neuroinflamação e Depressão

A literatura evidencia que a neuroinflamação pode estar intimamente ligada com o transtorno depressivo, desempenhando um papel importante no início e na progressão da depressão (Xia *et al.*, 2023).

A neuroinflamação envolve uma variedade de processos biológicos complexos, incluindo aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, respostas inflamatórias excessivas de citocinas e a ativação microglial. Estudos trazem que a micróglia se encontra altamente ativada em regiões cerebrais relacionadas à depressão, como córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior e ínsula durante episódio depressivo (Steiner *et al.*, 2011; Setiawan *et al.*, 2015; Wholeb *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Troubat *et al.*, 2021; Ji *et al.*, 2022).

Vários trabalhos demonstraram que a microglia interage com outro tipo de célula neuronal importante, os astrócitos (AST). Visando conduzir a regulação e resolução das respostas neuroinflamatórias, esta interação celular resulta na restauração da homeostase, mantendo a função cerebral fisiológica normal (Cartier *et al.*, 2014, Wee Yong, 2010).

Os AST desempenham um papel crucial na regulação da transmissão sináptica e da plasticidade neuronal, afetando a excitabilidade e a velocidade de condução neuronal. Estão

envolvidos na sincronização da atividade de neurônios e comunicação em áreas distintas do cérebro. Os AST no córtex pré-frontal podem modular o comportamento semelhante à anedonia, sintoma este característico do quadro depressivo (Codeluppi *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024).

Além disso, o estresse pode induzir modificações estruturais e funcionais nos AST. Um grande conjunto de evidências de estudos pré-clínicos e *post-mortem* sugere que os AST se encontram alterados em morfologia, função, número e/ou densidade em modelos animais de depressão e pacientes com transtorno depressivo maior (TDM) (Wang *et al.*, 2017; Murphy-Royal; Gordon; Bains, 2019; Dolotov *et al.*, 2022).

Cabe ressaltar que os antidepressivos aparentam influenciar as vias de sinalização intracelular e a expressão gênica de AST, levando a alterações na expressão de receptores e liberação de fatores tróficos. Tais interações podem impactar na fisiologia, morfologia e na abundância dos AST, podendo a viabilidade astrocitária servir como alvo viável para o tratamento da depressão (Czéh; Di Benedetto, 2013; Liu *et al.*, 2024).

Em resposta ao dano celular, os AST modificam a sua expressão gênica, crescem em tamanho, regulam positivamente as proteínas do citoesqueleto e aumentam em número. Na presença de doenças ou infecções no sistema nervoso central (SNC), os AST reativos podem sofrer remodelação morfológica, molecular e funcional. Vários receptores diferentes são expressos por astrócitos reativos, incluindo receptores que reconhecem padrões e receptores que respondem a citocinas. Como resultado, os astrócitos podem reagir a vários estímulos no microambiente do SNC, produzindo substâncias imunorreguladoras que podem promover ou restringir a inflamação, onde a inibição de astrócitos ativados leva a uma melhora no comportamento do tipo depressivo (Eldomiaty *et al.*, 2020; Escartin *et al.*, 2021; Lee; Wheeler; Quintana, 2022; Liu *et al.*, 2024).

A literatura demonstra que existem moléculas, como a escutelarina, que podem inibir a ativação de astrócitos estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) utilizando a via do *Toll-like Receptor 4* (TLR4) / Fator Nuclear κ B (NF- κ B). A escutelarina suprimiu a elevação induzida por LPS do Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e óxido nítrico sintase, assim como reverteu a regulação negativa da Interleucina-4 (IL-4) e do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), que, por sua vez, atenuou os comportamentos do tipo depressivo. Em contrapartida, todos os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), na faixa de doses administradas, demonstraram citotoxicidade significativa e apresentaram efeitos paradoxais na resposta inflamatória dos AST (Wu *et al.*, 2019; He *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2024).

Sendo assim, uma vez que os antidepressivos atualmente disponíveis apresentam citotoxicidade expressiva em astrócitos, métodos de atenuar a neuroinflamação astrocitária, reduzindo a citotoxicidade e utilizando a via do TLR4 demonstram ser uma estratégia eficaz para a prevenção e tratamento da depressão.

1.4 Toll-like Receptor 4

O receptor TLR4 é um sensor molecular chave da resposta inflamatória, presente também nas células astrocitárias, podendo reconhecer e responder especificamente a substâncias exógenas, como LPS ou lipooligossacarídeo (LOS), referidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Ao mesmo tempo, o TLR4 também pode ser ativado por moléculas endógenas liberadas de tecidos danificados ou células necróticas, como glicoproteínas e glicolipídios, que são conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Kawai; Akira, 2010; Xiao *et al.*, 2024).

O reconhecimento do LPS pelo TLR4 é uma das principais vias que desencadeiam a sua ativação. Do ponto de vista molecular, quando as bactérias Gram-negativas entram em contato com o organismo, as moléculas de LPS são detectadas pela primeira vez pela proteína solúvel de ligação ao LPS (LBP) desencadeando sucessivas interações. Posteriormente, moléculas individuais de LPS são transferidas da LBP para a proteína CD14, formando um complexo CD14/LPS (Zhang *et al.*, 2022).

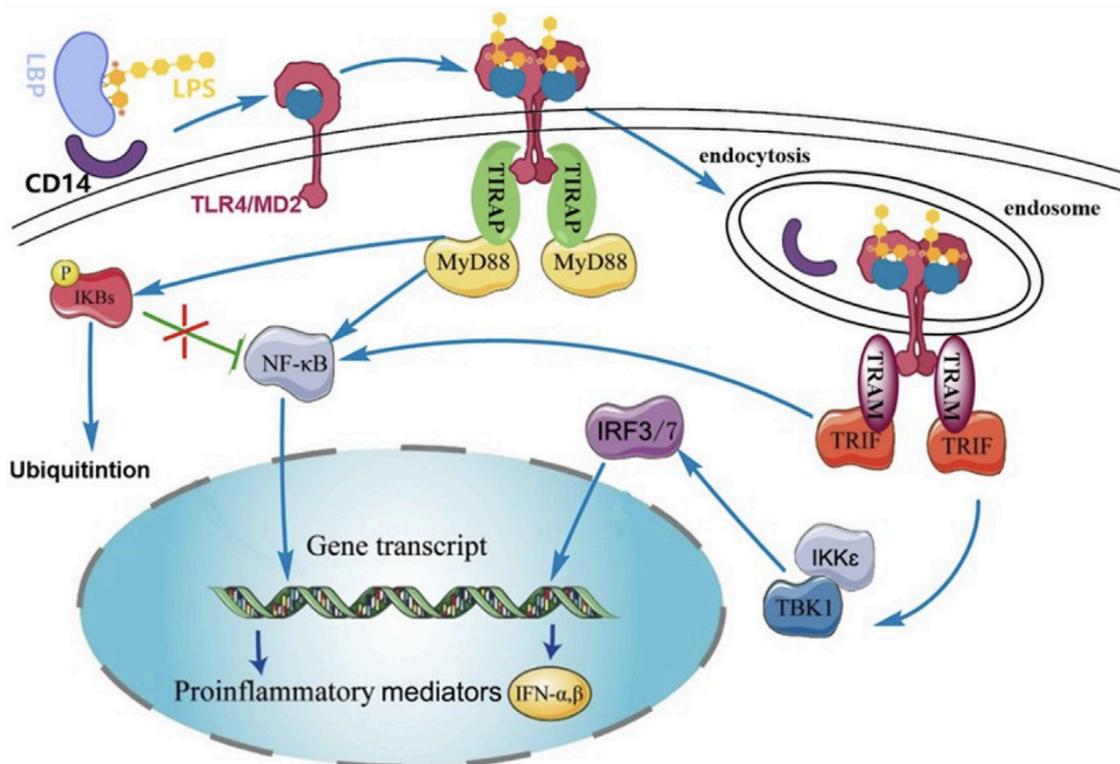
Em seguida, o CD14 se dissocia do complexo e transfere as moléculas individuais de LPS para uma das proteínas acessórias mais importantes da via, a proteína MD-2, iniciando assim, simultaneamente, a dimerização do receptor TLR4. O resultado é a formação de um complexo chamado TLR4/MD-2/LPS (Krüger *et al.*, 2017).

Em seguida, o complexo TLR4/MD-2/LPS, pode seguir por duas vias: A via do MyD88 ou TRIF resultando na transdução de sinais intracelulares. Pela via de sinalização dependente de MyD88, o TLR4 interage primeiro com a proteína adaptadora contendo o domínio do receptor *Toll*-interleucina-1, TIRAP. Posteriormente, o TIRAP recrutado pelo TLR4 liga-se ao MyD88 e desencadeia cascatas de sinalização, incluindo a fosforilação do inibidor- κ B (I κ B) promovendo respostas inflamatórias mediadas por NF- κ B. Por sua vez, NF- κ B entra no núcleo da célula, liga-se aos genes alvo, inicia a transcrição e tradução de genes inflamatórios e expressa várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, Interleucina-12 (IL-12) e IL-1 β (Fitzgerald *et al.*, 2001; Sughra *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018).

Porém existe outra via de ativação do TLR4, onde o mesmo é internalizado pelas células por meio de endocitose e se liga ao segundo conjunto de proteínas adaptadoras: TRAM e TRIF, estimulando a via independente do MyD88. Esta via leva à ativação de dois inibidores não clássicos das quinases *kappaB*: IKK e IKK ϵ , que ativam o interferon regulador-3 (IRF3) e o regulador de interferon-7 (IRF7). IRF3 e IRF7 induzem a expressão do interferon tipo I, resultando em resposta inflamatória (Tailor *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2013). Além disso, a via independente de MyD88 também induz ativação adicional de NF- κ B, que gera citocinas pró-inflamatórias, semelhante à via dependente de MyD88 (Sato *et al.*, 2003; Cusson-Hermance *et al.*, 2005). Conseqüentemente, a ativação do TLR4 é o passo inicial da resposta inflamatória e um alvo terapêutico para doenças inflamatórias, como pode ser visto na Figura 1 abaixo.

Como descrito, toda a cascata é desencadeada a partir da ativação do TLR4, porém a proteína MD-2 é crucial para a dimerização do receptor e início de sua sinalização, sendo uma ótima possibilidade de alvo terapêutico com o intuito de inibir a cascata neuroinflamatória oriunda do TLR4 astrocitário. Desta forma, estudos envolvendo novas moléculas oriundas de produtos naturais, como as Riparinas, tornam-se interessantes para que sejam elucidados os seus efeitos nesta via. Visando prover uma nova futura alternativa terapêutica.

Figura 1 - Cascata de ativação do TLR4 pelo LPS.



1.5 Riparina IV

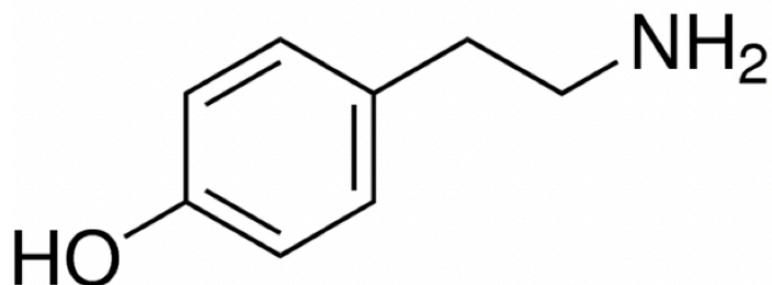
As riparinas são alcalóides não heterocíclicos formados pela união da tiramina e do ácido benzoico, isoladas dos frutos não maduros da planta amazônica *Aniba riparia*. A tiramina (Figura 2), por sua vez, é reconhecida como tendo um papel central na atividade neural, sendo produzida de forma endógena, em pequenas quantidades, onde aparenta modular os efeitos da dopamina. Foram identificadas três tipos de Riparinas na planta, a Riparina I, II e III. Tendo como exemplo as estruturas moleculares das Riparinas naturais, a RIP IV foi sintetizada pela primeira vez em 1990 (Barbosa-Filho *et al.*, 1987; Chaves *et al.*, 2019).

A literatura elucida que Riparina I apresentou efeitos ansiolíticos e antidepressivos no SNC, provavelmente devido a sua interação com os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico. Foi evidenciado, ainda, diminuição tanto na nocicepção quanto no volume do edema de pata induzidos pela ação do glutamato, sugerindo que a Riparina I possa atuar como antagonista dos receptores glutamatérgicos envolvidos no processo inflamatório. A Riparina I apresenta propriedades anti-inflamatórias pela inibição de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, glutamato e óxido nítrico, sem aparentemente nenhum envolvimento do sistema opióide neste processo (Sousa *et al.*, 2005; Araújo, 2007; Sousa *et al.*, 2014; Oliveira, 2019).

A Riparina II, também, apresenta atividade antinociceptiva, evidenciada nos modelos de indução por ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato. Cabe ressaltar que a Riparina II desencadeia efeitos ansiolíticos e antidepressivos que são desprovidos de interferência da atividade locomotora espontânea em camundongos (Sousa *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2018; Oliveira, 2019).

Estudos com Riparina III demonstraram sua eficácia no tratamento da depressão associada à ansiedade, apresentando também, assim como as Riparinas supracitadas, efeito antinociceptivo em modelos de dor em camundongos. Esta ação parece estar relacionada com receptores, dopaminérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos e glutamatérgicos (Melo *et al.*, 2006; Mallmann *et al.*, 2021; Oliveira, 2019).

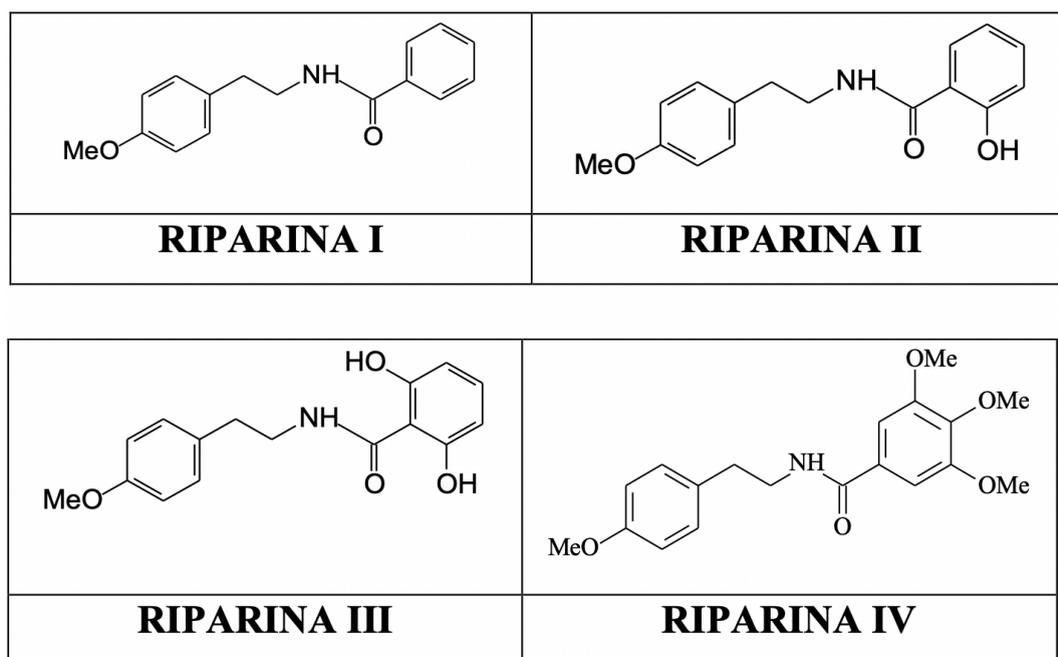
Figura 2 - Estrutura molecular da Tiramina.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

Devido a atividade comprovada das riparinas I, II e III nos modelos comportamentais de depressão (Sousa *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2018; Melo *et al.*, 2013, 2006; Oliveira, 2017; Sousa *et al.*, 2005, 2004; Teixeira *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2015) e ansiedade (Melo *et al.*, 2006; Oliveira, 2012; Sousa *et al.*, 2005, 2007, 2004), sendo a riparina IV um análogo estrutural dessas substâncias, torna-se relevante a investigação do seu potencial farmacológico em outras vias da etiologia da depressão. A similaridade entre as Riparinas pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 - Estruturas moleculares das Riparinas I, II, III e IV.



Fonte: Dias, 2017.

2 Justificativa

Historicamente, de acordo com o *Global Burden of Disease Study* (2015), a depressão já foi considerada como a terceira principal causa de incapacidade em todo o mundo. Em 2017, o número de pessoas que sofriam de depressão chegava a 260 milhões em todo o mundo. Estudos mostraram que aproximadamente 19,7% e 11,3% dos adultos nos EUA já relataram sentir-se deprimidos pelo menos uma vez por mês e uma vez por semana, respectivamente. Com o estilo de vida indesejável e a pressão no trabalho, a carga da depressão aparenta estar se agravando. (Cao *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2023).

No Brasil, a depressão se mostra de forma preocupante. Pesquisas têm identificado lacunas nos dados quanto a sua prevalência. Isso se dá, provavelmente, devido à subnotificação de casos, pois os pacientes relutam em se autorelatar. Isto, associado ao estigma social, proíbe as suas visitas aos hospitais psiquiátricos, dificultando o tratamento e a real percepção do problema de saúde (Heok; Gan, 2010; Fuji *et al.*, 2012; Meleiro *et al.*, 2023).

A literatura aponta que a baixa conscientização entre as pessoas sobre o tema, pode ser atribuída à falta de educação e às crenças culturalmente estigmatizantes sobre o tratamento deste transtorno. A prevalência de depressão no Brasil, variou de 4,1% a 21,8%, o que é inferior em comparação com as Américas e a Europa (15,9–28,9% e 32,2%, respectivamente). A desigualdade socioeconômica, a urbanização e as más condições de vida presentes em território nacional contribuem para os transtornos de saúde mental (Galvão *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2021; Meleiro *et al.*, 2023).

Cerca de 30% dos adolescentes com depressão não respondem aos tratamentos disponíveis. Os idosos, da mesma forma, apresentam dificuldades semelhantes. Estima-se que 50% dos indivíduos idosos não respondem adequadamente à terapêutica antidepressiva de primeira linha em quadros de depressão tardia. Consequentemente, apresentam um risco aumentado de recaída, são mais propensos a não aderirem ao tratamento para condições físicas comórbidas e apresentam um risco aumentado de morte precoce, incluindo suicídio (March *et al.*, 2004; Lenze *et al.*, 2008; Kennard *et al.*, 2009a, Kennard *et al.*, 2009b; Thai *et al.*, 2024; Patrick *et al.*, 2024).

Devido ao rápido crescimento populacional, desenvolver uma compreensão abrangente das considerações clínicas e relacionadas ao tratamento da depressão deve ser um imperativo da saúde pública (UNFPA Brasil, 2022; Patrick *et al.*, 2024).

O quadro farmacológico disponível para o tratamento da depressão inclui agentes sintetizados como os inibidores seletivos da recaptção de 5-HT (ISRS), inibidores da MAO, antidepressivos tricíclicos (ADTs) e atípicos. Estes medicamentos têm sido amplamente utilizados clinicamente em pacientes com depressão (Duman; Voleti, 2012). Porém, apenas um terço dos pacientes têm resposta benéfica ao tratamento a esses agentes, apresentando complicações relacionados aos efeitos adversos como: náuseas, vômitos, perturbação do sono, sedação, disfunção sexual e ganho de peso (David; Gourion, 2016; Dai *et al.*, 2022)

Nesse sentido, o estudo das plantas medicinais, visando descobrir novas alternativas terapêuticas, faz-se necessário. Já existem exemplos de descobertas atuais importantes, como o flavonóide farmacologicamente ativo da *Hypericum perforatumis*, a hipericina. Este fitoterápico encontra-se disponível na modalidade *over-the-counter* nos EUA, sendo indicada como antidepressivo (Yuan *et al.*, 2020; Dai *et al.*, 2022).

Atualmente, estudos demonstram que a etiologia da depressão apresenta-se de forma plural. Foi proposto que as ações dos processos inflamatórios, e das citocinas pró-inflamatórias em particular, no cérebro podem ser responsáveis pela patogênese dos transtornos depressivos. Esta hipótese tem sido referida como a “hipótese inflamatória da depressão” (Tang *et al.*, 2016).

Foi demonstrado em animais que a RIP IV apresentou efeito antidepressivo e neuroprotetor em modelos utilizando corticosterona, porém este modelo estuda a via neuroendócrina. Como a depressão é uma patologia que envolve não só a via neuroendócrina, mas neurogênica, neuroinflamatória e possivelmente outras, moléculas que possam atuar em múltiplas áreas da patogênese depressiva podem produzir melhor eficácia frente aos fármacos atualmente utilizados (Chaves *et al.*, 2019; Chaves *et al.*, 2020; Sartori *et al.*, 2020).

Diante do pressuposto, faz-se necessário elucidar a atividade da RIP IV frente ao processo neuroinflamatório vinculado à depressão. Buscando uma futura alternativa para tratamento deste quadro patológico.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos antidepressivos e citoprotetores da Riparina IV em camundongos C57BL/6 submetidos à exposição de LPS, pela via neuroinflamatória.

3.2 Objetivos Específicos

- ∴ Verificar as interações entre a RIP IV e o complexo TLR4-MD2;
- ∴ Avaliar a viabilidade celular de AST expostos ao LPS e tratados com RIP IV;
- ∴ Avaliar o mecanismo de morte celular de AST expostos ao LPS e tratados com RIP IV;
- ∴ Avaliar o efeito da RIP IV no autocuidado;
- ∴ Verificar os efeitos da RIP IV em relação a memória dos animais expostos ao LPS;
- ∴ Investigar o efeito ansiolítico e antidepressivo da RIP IV.

4 Materiais e Métodos

4.1 Riparina IV

A RIP IV foi sintetizada no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, pelo professor Barbosa Filho, a partir do acoplamento do éter metílico da tiramina com o éster do ácido 2,5 dihidroxibenzóico (Barbosa-filho; Yoshida; Gottlieb, 1990; Seixas, 1996). Para os experimentos em animais, a RIP IV foi dissolvida em Tween® 80 com solução salina 0,9% para obter a dose de 50mg/kg por via oral (Chaves *et al.*, 2020).

Para os testes *in vitro*, a RIP IV foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,2 M para que fosse obtido uma solução-estoque. A seguir as soluções preparadas para os experimentos de viabilidade celular foram diluídas de forma seriada, em solução salina tampão fosfato estéril PBS, sendo esta constituída de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; pH 7,4. Ao final da diluição foram obtidas as seguintes concentrações 1000µM, 500µM, 250µM, 125µM 62,5µM, 31,25µM e 15,62µM respectivamente para avaliar a viabilidade celular. Para avaliar o quadro de morte celular, as concentrações de 15,62µM, 7,81µM e 3,90µM foram obtidas de forma seriada, a partir da solução-estoque, seguindo o padrão acima citado. Importante ressaltar que a concentração final do DMSO não ultrapassou 0,5%, uma vez que concentrações acima desta margem apresentam toxicidade celular (Sampaio *et al.*, 2016).

4.2 Lipopolissacarídeo

Visando promover o quadro inflamatório via TLR4/MD-2, foi utilizado o LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 055:B5) oriundo da empresa Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA.

A dose utilizada nos animais foi de 0,5mg/kg, sendo administrada por via intraperitoneal (I.P.). O LPS foi dissolvido em solução salina estéril 0,9%. O manejo do protocolo e a dose no presente trabalho, referente ao LPS, foi baseada nos estudos de Silva e colaboradores (2024).

Nos testes *in vitro*, as células foram desafiadas com LPS, na concentração de 50µg/ml, sendo este dissolvido em solução salina tampão fosfato estéril PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; ph 7,4 (Zhao *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2023).

4.3 Escitalopram

O escitalopram (ESC; Lexapro®, H.Lundbeck A/S Dinamarca) foi o antidepressivo utilizado como controle positivo para os testes *in vivo*. Seguindo a metodologia de Tomaz e colaboradores (2020), ESC (10mg/kg) foi diluído em solução salina 0,9% e administrado por gavagem pelo período de cinco dias consecutivos.

Para realização dos testes *in vitro* não foi utilizado nenhuma substância controle, uma vez que o presente trabalho objetiva avaliar o perfil modulatório apenas da RIP IV em AST expostos ao LPS.

4.4 Docking Molecular

As técnicas de ancoragem molecular (*docking* molecular) permitem estimar a energia livre de ligação entre proteínas e ligantes antes mesmo da síntese dos compostos. Essa ferramenta torna-se essencial para selecionar compostos direcionados a um alvo específico. Esta metodologia auxilia, também, no desenho racional de candidatos que apresentem melhor interação com o sítio ativo de um receptor determinado (Rodrigues *et al.*, 2012).

4.4.1 Preparação dos ligantes e da proteína-alvo

As estruturas químicas da Riparina I (CID: 3083797), do agonista co-cristalizado Lipídio X (LPS, CID: 123907) e do antagonista Eritoran (CID: 6912404) foram obtidas no repositório PubChem nas conformações 2D. A obtenção da Riparina IV, molécula de interesse, foi realizada por meio da adição de grupamentos metoxi (OCH₃) aos carbonos R3, R4 e R5 do anel A da Riparina I utilizando o *software* Avogadro® versão 1.2.0, o qual também foi utilizado para a otimização das estruturas 3D com menor energia conformacional aplicando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (Hanwell *et al.*, 2012).

A proteína-alvo é o Receptor Toll-Like 4 (TLR4) associado ao co-receptor MD-2 (detentor do sítio de ligação hidrofóbico) de endotoxinas, a qual foi obtida a partir do complexo TLR4/MD-2/LPS depositado no repositório *Protein Data Bank* (PDB ID: 3VQ2), que consiste em um homodímero do receptor TLR4/MD-2 ligados ao LPS. A otimização da proteína consistiu no isolamento da unidade monomérica TLR4/MD-2, após retirada de moléculas de água, solventes, LPS e a segunda unidade monomérica TLR4/MD-2/LPS utilizando o *software* UCSF Chimera™ versão 1.15, além da adição de hidrogênios polares utilizando o *software* AutoDockTools™ versão 1.5.6 (Pettersen *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2009).

4.4.2 Simulação de docking molecular e obtenção dos resultados

As simulações de ancoragem entre ligante e proteína-alvo foram realizadas utilizando o *software* AutodockVina™, que se baseia no Algoritmo Genético Lamarckiano. As simulações de docking molecular foram realizadas em triplicata com exaustividade de 32 simulações, conforme recomendação do *software* AutodockVina™ (Trott; Olson, 2010). A definição do GridBox que envolvesse toda a estrutura da proteína-alvo foi feita utilizando o *software* AutoDockTools™, definindo os eixos $x = 2,62$, $y = 13,398$ e $z = 3,932$ e as dimensões de $x = 84$, $y = 70$ e $z = 110$ em angstrom (Å). A técnica de redocking foi realizada utilizando o agonista co-cristalizado, lipídio X (LPX) a fim de validar as simulações de docking. Após as simulações, a melhor pose foi selecionada a partir dos valores de energia

livre de Gibbs (ΔG), sendo recomendável valores menores ou iguais a -6,00 Kcal/mol e valores de RMSD (*Root-Mean-Square Distance*) menores ou iguais a 2,0 Å (Magalhães *et al.*, 2022). A região de ancoragem e os tipos de interações foram obtidos utilizando o *software* Discovery Studio Visualizer™ versão 21.1.0.20298.

4.5 Testes *in vitro*

4.5.1 Manutenção e cultivo celular

As linhagens celulares empregadas no presente trabalho foram de AST murinos, isoladas e fornecidas pelo grupo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (Erustes *et al.*, 2018). Frascos de polietileno foram utilizados para o cultivo, medindo de 75 cm² e com volume de 250 mL. O meio de cultura utilizado foi o *Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

O procedimento se deu alocando as células na estufa, para incubação, sob as seguintes condições: temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, sendo o crescimento celular monitorado com auxílio de microscópio invertido a cada 24 horas.

Ao atingir 80% de confluência, as células foram destacadas utilizando tripsina 0,05% em EDTA 0,53 µM. Com a suspensão das células efetuadas, as mesmas foram contadas em hemocitômetro tipo câmara de Neubauer e a densidade celular foi avaliada utilizando o corante de exclusão azul de Tripán.

Após o procedimento de contagem, as células foram subcultivadas em placas de 6 ou 24 poços a uma concentração de 5 x 10⁴ células/ml ou em placas de 96 poços na concentração de 1 x 10⁵ células/ml, variando conforme os procedimentos utilizados.

4.5.2 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade da RIP IV nas linhagens celulares tendo como base o trabalho de Mosmann (1983). O teste acima baseia-se na capacidade da enzima succinato desidrogenase, ativa em mitocôndrias e no citosol de células viáveis, converter o MTT. O MTT possui a característica de ser hidrossolúvel e de cor amarelada, porém, caso ocorra a conversão em cristais de formazan, estes são de cor púrpura. Com a presença do produto formado devido a conversão, o teste pode ser avaliado (Denizot; Lang, 1986).

Na sequência, a RIP IV foi adicionada nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62 $\mu\text{M}/\text{mL}$ à cultura celular. Após 24 horas de incubação, as células permaneceram por 3 horas com um novo meio (200 μL) contendo 10% de MTT, na concentração de 5 mg/mL em cada poço. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 μL 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 ao leitor de microplacas para a medição da absorbância a 595 nm. A viabilidade foi determinada pelo aumento da conversão do MTT, considerando a média da absorbância do controle como 100%, enquanto os outros valores receberam valores proporcionais de acordo com a absorbância apresentada.

4.5.3 Avaliação do Mecanismo de Morte Celular

Para avaliar o potencial de dano do LPS, foi realizado o teste de citometria de fluxo com a marcação de 7-AAD, que indica um processo de morte celular. O protocolo experimental foi desenvolvido para investigar o efeito neuroprotetor da RIP IV nas células após as mesmas serem desafiadas com LPS. Assim, após determinar a melhor concentração de RIP IV para avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade das substâncias, as células foram tratadas com LPS por 12 horas. Posteriormente, as células receberam tratamento com RIP IV. As células permaneceram em contato com LPS + RIP IV por 12 horas e, em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a morte celular. Foram mensurados quatro eventos, sendo eles: células não marcadas, indicando ausência de dano, células marcadas apenas com ANX (7-AAD[-] ANX [+]), demonstrando apoptose, células marcadas apenas com 7-AAD (7-AAD[+] ANX [-]), representando necrose e células que apresentaram dupla marcação, tanto com 7-AAD como ANX (7-AAD[+] ANX [+]).

4.5.4 Avaliação da integridade de membrana e exposição da fosfatidilserina

Para avaliar o mecanismo de morte celular, foram utilizadas as substâncias fluorescentes Anexina V (ANX) (conjugada com ficoeritrina) e 7-amino-actinomicina D (7-AAD). Durante o processo apoptótico, ocorre a externalização da fosfatidilserina, aumentando a afinidade pela ANX. A marcação com 7-AAD indica necrose, pois a membrana celular apresenta-se comprometida e o marcador consegue ligar-se ao DNA celular.

Para a análise, as células foram suspensas em 100 µL de tampão de ligação e adicionou-se 5 µL de 7-AAD e 5 µL de ANX (0,5 mg/mL cada). O procedimento foi realizado utilizando um kit comercial (*Anexin V PE Apoptosis Detection Kit I*, BD Biosciences®). Após 15 minutos de incubação no escuro, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD Biosciences®). Para a análise dos resultados, as células não marcadas foram consideradas viáveis, as células com dupla marcação foram consideradas em processo apoptótico tardio, marcadas com ANX indicativo de apoptose, e com 7-AAD, necrose (Rocha *et al.*, 2012).

4.6 Animais

Os animais escolhidos para o presente estudo foram camundongos C57BL/6 machos, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), com peso entre 15 - 25 g. Os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro (12/12h), com água e comida à vontade. 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: 6321230822.

4.6.1 Delineamento Experimental - Animais

Buscando avaliar os efeitos da RIP IV na via neuroinflamatória da depressão, o presente estudo adotou o modelo animal de inflamação por intermédio da exposição sistêmica ao LPS de *Escherichia coli*. O protocolo transcorreu por dez dias, onde, no período da manhã, o LPS (0,5 mg/kg) foi administrado via intraperitoneal. A partir do sexto dia, iniciou-se o tratamento por gavagem, utilizando salina, RIP IV ou escitalopram, após 60 minutos da administração contendo LPS (Mello *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2024). Os grupos, contendo 8 - 10 animais cada, estão representados a seguir:

∴ **CT**: Os animais receberam injeções via I.P. contendo solução salina 0,9% durante dez dias. Do 6º ao 10º dia receberam, também, a mesma solução por gavagem;

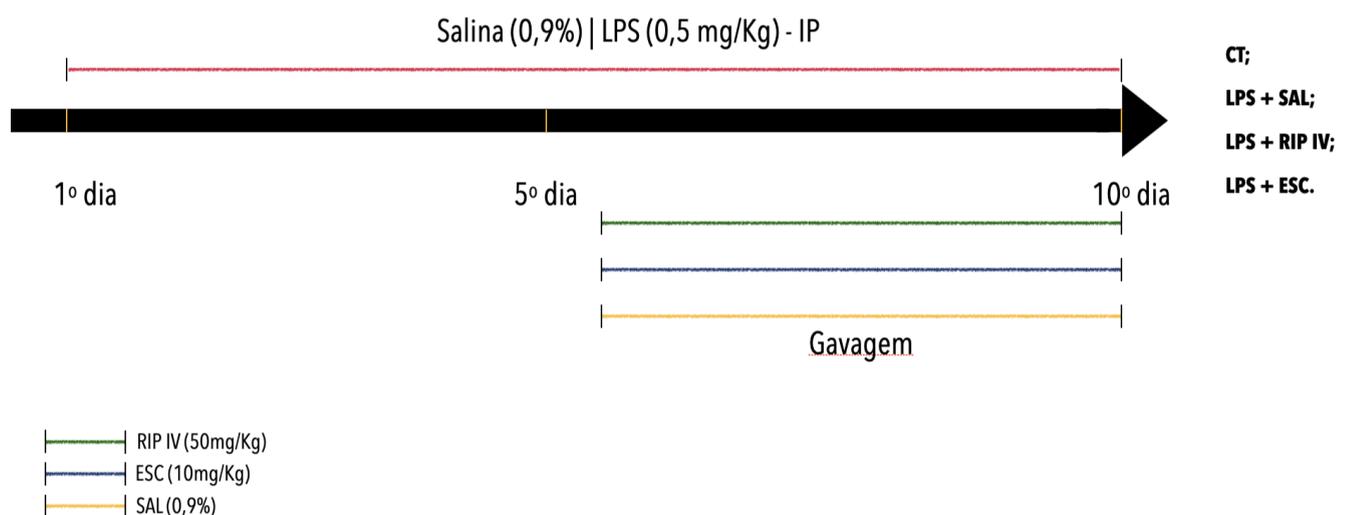
∴ **LPS + SAL**: Os animais receberam injeções via I.P. com LPS (0,5 mg/kg) durante dez dias. Do 6º ao 10º dia receberam, também, solução salina 0,9% por gavagem;

∴ **LPS + RIP IV**: Os animais receberam injeções via I.P. com LPS (0,5 mg/kg) durante dez dias. Do 6º ao 10º dia receberam, também, RIP IV (50 mg/kg) por gavagem;

∴ **LPS + ESC**: Os animais receberam injeções via I.P. com LPS (0,5 mg/kg) durante dez dias. Do 6º ao 10º dia receberam, também, ESC (10mg/kg) por gavagem.

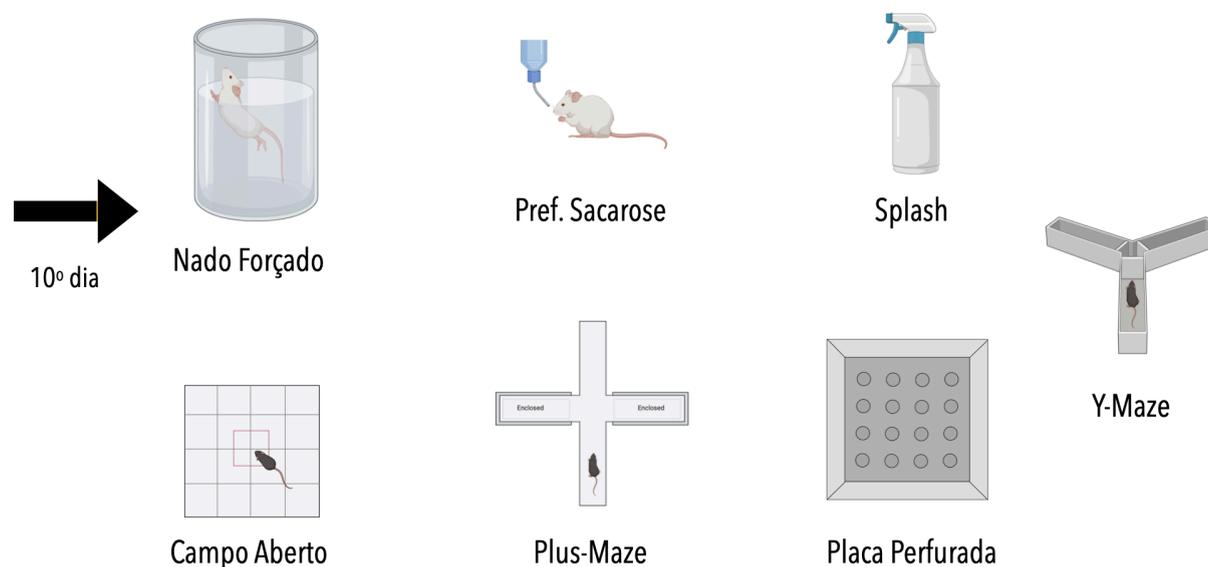
Ao décimo primeiro dia, os animais foram submetidos aos testes comportamentais com a finalidade de avaliar os efeitos das substâncias acima descritas pelo período de 10 dias. Após os experimentos, os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações da diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos e suas atualizações. A Figura 4 abaixo ilustra o esquema experimental completo:

Figura 4 - Delineamento experimental animal.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

Figura 5 - Delineamento experimental comportamental dos animais.



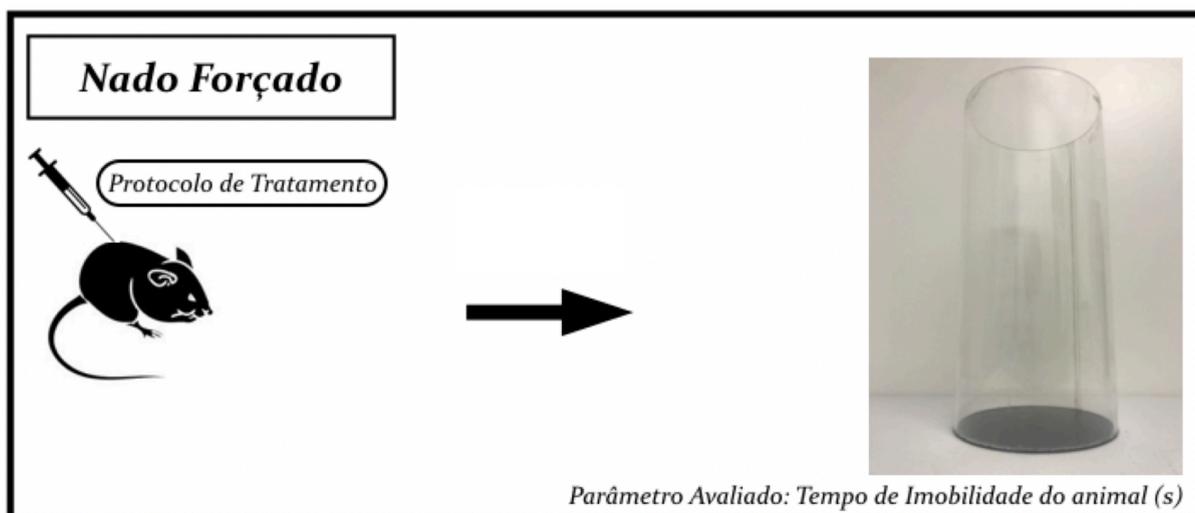
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

4.6.2 Testes Comportamentais

4.6.2.1 Nado Forçado

Considerado padrão ouro na avaliação comportamental de roedores para identificar o comportamento depressivo-símile, o teste do nado forçado consiste em submeter os animais, de forma individual em cilindro de acrílico (aproximadamente - altura: 35 cm; diâmetro: 24 cm) contendo água, a temperatura entre 25 - 27 °C, durante 5 minutos. O teste busca avaliar o comportamento de desesperança e/ou desmotivação apresentado pelo animal que se encontra à deriva na água. O parâmetro utilizado neste teste é o tempo de imobilidade do mesmo, sendo mensurado quando o animal faz, apenas, mínimos movimentos para manter a cabeça fora da superfície da água dentro do cilindro (Porsolt, 1978).

Figura 6 - Teste do Nado Forçado.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

4.6.2.2 Teste da Preferência pela Sacarose

A Anedonia é caracterizada pela incapacidade de sentir prazer, e neste teste, é representada pela redução da preferência dos animais pela solução de sacarose, indicando um comportamento semelhante ao depressivo.

Inicialmente, os camundongos foram adaptados a duas garrafas de solução de sacarose a 2% durante 24 horas. Após este período, uma das garrafas foi substituída por água sem adição de sacarose por mais 24 horas. Após a adaptação, todos os animais foram privados de água e comida por 1 hora. Após o período de privação, os animais foram colocados em gaiolas individuais e expostos a duas garrafas, uma contendo 2% de solução de sacarose e a outra contendo água sem adição de sacarose, ambas com volume previamente aferido. O teste teve a duração de 3 horas, após as quais os volumes de solução de sacarose e água sem adição de sacarose 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, usando a fórmula a seguir (Wu *et al.*, 2022):

Figura 7 - Cálculo e Teste da Preferência pela Sacarose.

$$\text{Preferência pela Sacarose} = \frac{\text{Consumo de Sacarose}}{\text{Consumo de Água} + \text{Consumo de Sacarose}} \times 100$$



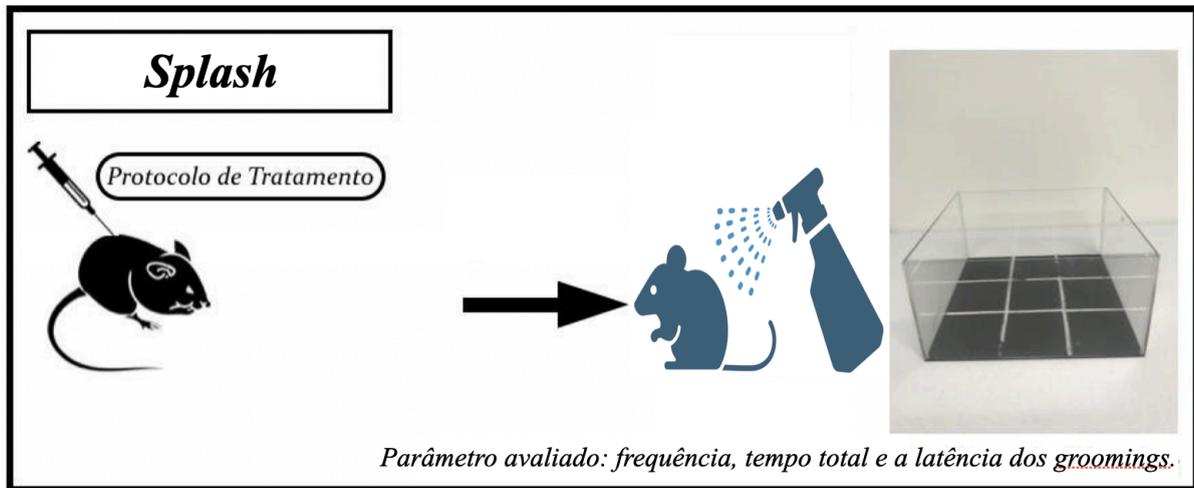
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

4.6.2.3 *Splash*

Com o intuito de avaliar o autocuidado dos animais e fazer o comparativo com a sintomatologia depressiva, foi preparado previamente uma solução de sacarose a 10% e separada. Cada animal, de forma individual, foi submetido a esguichada desta solução sobre a sua pelagem dorsal em uma caixa transparente. Uma vez que a viscosidade da solução de sacarose causa alterações na pelagem do animal, o animal tende a se mostrar incomodado. Com o aspecto de sujeira simulado, a tendência natural do animal é praticar a medida de autolimpeza, conhecida como *grooming*. O teste avalia a redução deste comportamento, uma vez que ele pode ser traduzido como desmotivação do animal estudado, sendo um comportamento comparativo à depressão.

O teste teve duração de 5 minutos após a solução ser aplicada. Foram avaliadas a frequência, o tempo total e a latência dos *groomings* realizados pelos animais. Para evitar vieses, após cada análise, o aparato foi limpo com etanol a 70% (Kong *et al.*, 2023; Fawzi *et al.*, 2024).

Figura 8 - Teste do *Splash*.

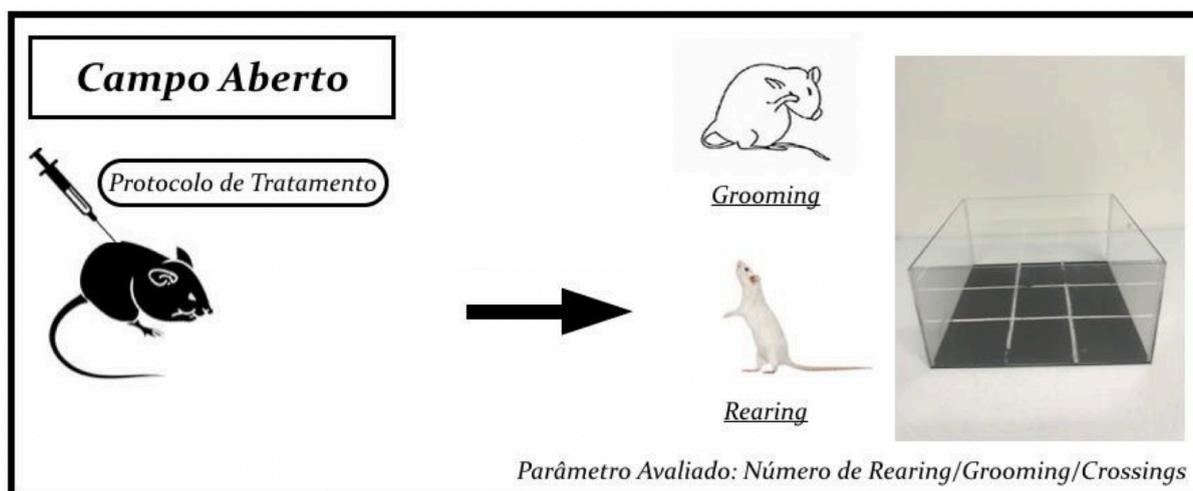


Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

4.6.2.4 Teste do Campo aberto

Este teste foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal e promover um ambiente ansiogênico. O aparato utilizado na realização deste teste foi composto de acrílico, com paredes transparentes e fundo preto, medindo 30 cm x 30 cm x 15 cm, tendo marcações no fundo dividindo em nove quadrados de tamanhos iguais à área total basal do aparato. Cada camundongo foi colocado na zona central e o número de quadrados atravessados (*crossings*), número de *groomings* e *rearings* foram contabilizados pelo período de 5 minutos (Archer, 1973, Seibenhener; Wooten, 2015; Thum *et al.*, 2024).

Figura 9 - Teste do Campo Aberto.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

4.6.2.5 *Pluz Maze*

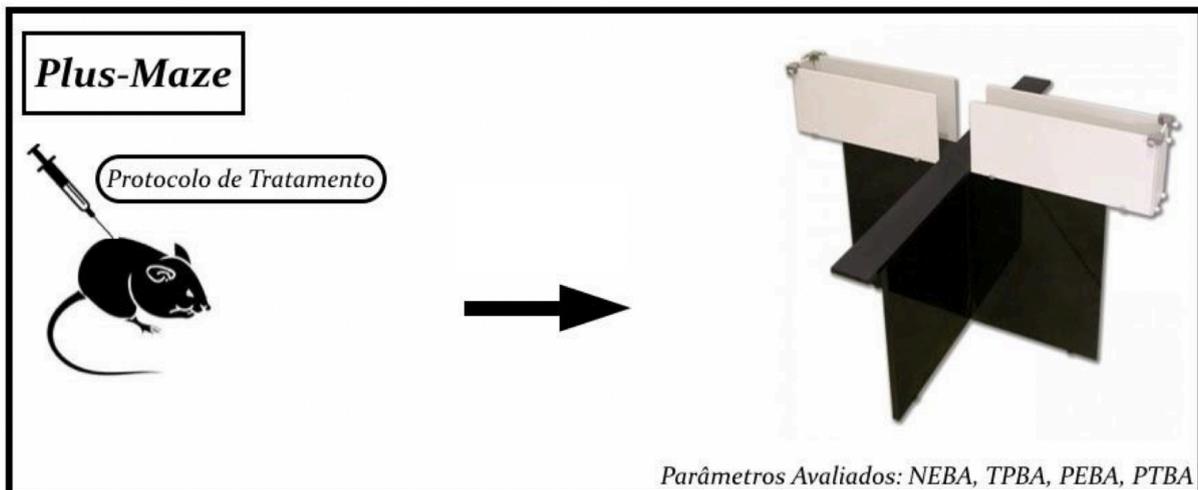
O método descrito inicialmente por Lister (1987) avalia o potencial efeito ansiolítico e ansiogênico da substância em animais. O aparato é formado por dois braços abertos, medindo 30 cm x 5 cm, e dois braços fechados, medindo 30 cm x 5 cm x 25 cm, dispostos de maneira oposta, formando uma cruz elevada a 45 cm do solo. Ambos os braços, tanto abertos quanto fechados, são conectados por uma plataforma central, medindo 5 cm x 5 cm.

Cada animal foi colocado na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e seu comportamento foi observado por um período de 5 minutos. O número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados foram registrados, mas para análise estatística, os dados foram relacionados aos braços abertos. Assim, foram avaliados o número de entradas nos braços abertos (NEBA), a porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e a porcentagem de permanência nos braços abertos (PTBA). Para calcular a PEBA e a PTBA, foram utilizadas as fórmulas abaixo:

Figura 10 - Cálculo e Teste do *Plus Maze*.

$$PEBA = \frac{\text{Número de entradas nos braços abertos}}{\text{Número de entradas no total (em ambos os braços)}} \times 100$$

$$PTBA = \frac{\text{Tempo nos Braços Abertos}}{\text{Tempo total (em ambos os braços)}} \times 100$$

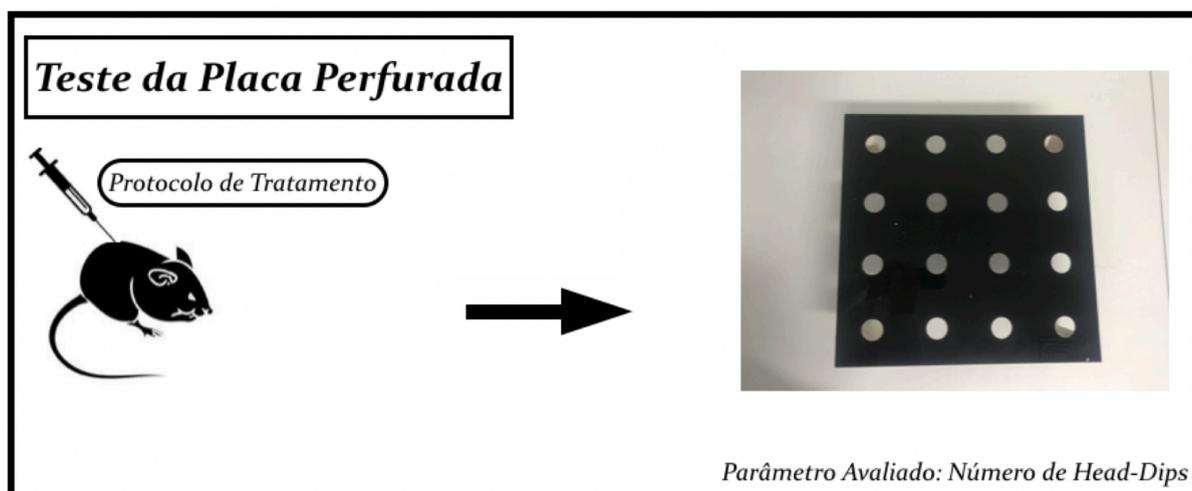


Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

4.6.2.6 Teste da Placa Perfurada

Utilizado para avaliar o comportamento exploratório e a ansiedade em camundongos, o parâmetro utilizado para análise no teste da placa perfurada foi o número de vezes que o animal introduziu a cabeça nos buracos (*Head-Dips*), durante o período de 5 minutos. O aparato utilizado foi uma placa furada idealizada por Clark, Koster e Person (1971), com medidas de 60 cm x 30 cm, contendo 16 buracos espaçados uniformemente.

Figura 11 - Teste da Placa Perfurada.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

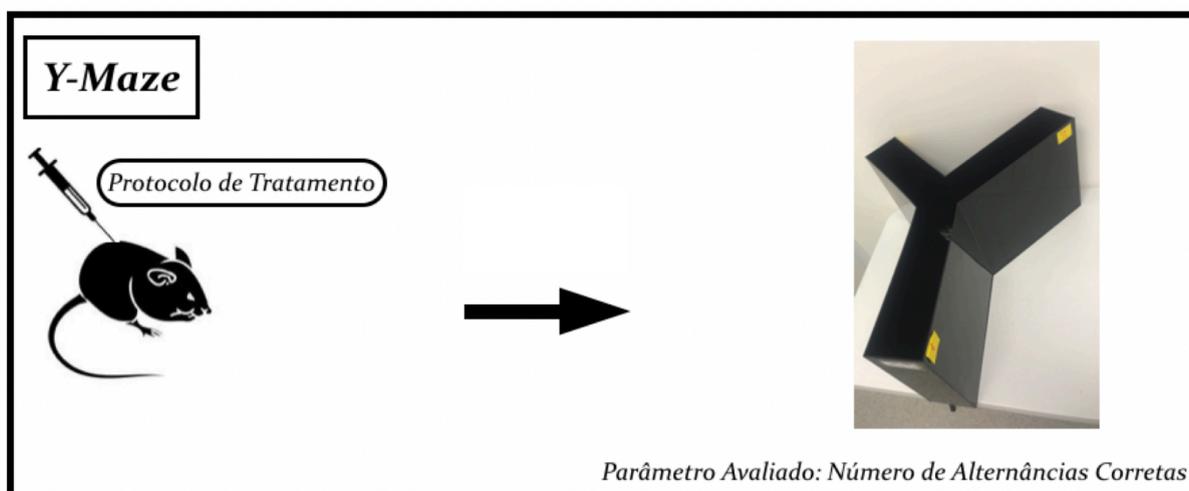
4.6.2.7 Y Maze

O teste do Y maze pode ser usado para mensurar memória a curto prazo, comportamento estereotipado e atividade locomotora geral (Kokkinidis *et al.*, 1976; Onaolapo *et al.*, 2012). O aparato apresenta três braços de tamanho e cor iguais, no formato de um Y, com cada braço medindo 40 cm x 15 cm x 7 cm, feito de acrílico.

Todos os braços foram sinalizados com um número (1, 2 ou 3), para identificação. Cada camundongo foi colocado em um dos braços, tendo ele a oportunidade de explorar e se locomover de forma livre por todo o aparato.

O registro do número de alternâncias de cada animal dentro do aparato foi realizado, onde a alternância pode ser definida quando o animal entra nos três braços consecutivamente (exemplificando: o animal fez a seguinte sequência: 1 – 2 – 3 – 1 – 3 – 2 – 2 – 1 – 3, conta-se nove vezes nos braços realizando quatro alternâncias corretas). O cálculo das alternâncias considerou a razão entre as alternâncias corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), sendo o resultado multiplicado por 100 (YAMADA *et al.*, 1996; Dall'igna *et al.*, 2007).

Figura 12 - Teste do Y-Maze.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi conduzida utilizando o 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, para os resultados paramétricos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (post hoc). Para os resultados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (post hoc). Em todas as análises, os valores foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Testes *in silico*

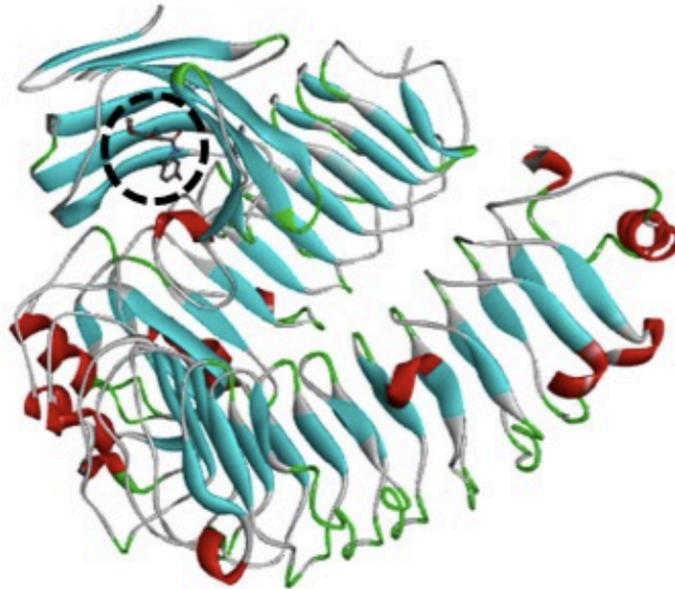
5.1.1 *Docking* Molecular

Cada ligante foi submetido ao processo de simulação por *docking* molecular, buscando encontrar a melhor pose e local da proteína-alvo para ligação. Tanto a RIP IV, como o ERI e LPX, apresentaram similar posicionamento de ancoragem no co-receptor MD-2. Vale

ressaltar que este possui uma cavidade hidrofóbica com afinidade de ligação por endotoxinas, como expresso abaixo.

Figura 13 – Região de ancoragem da melhor pose da Riparina IV na proteína-alvo.

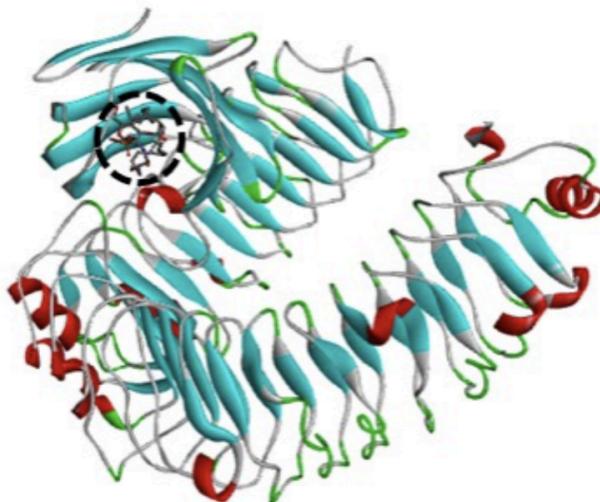
Riparina IV



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

Figura 14 – Região de ancoragem da melhor pose do Lipídio X na proteína-alvo.

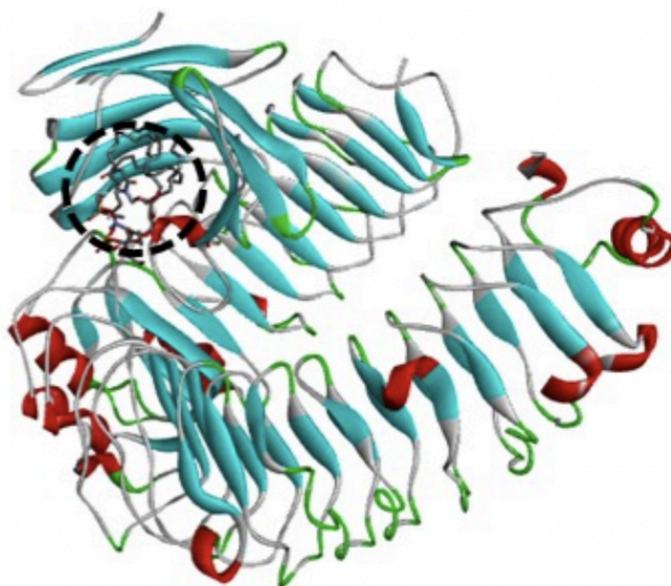
Lipídio X



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

Figura 15 – Região de ancoragem da melhor pose do Eritoran na proteína-alvo.

Eritoran



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

Os ligantes supracitados apresentaram energia de afinidade menor que -6,00 Kcal/mol. Em seguida verificou-se os valores de RMSD, sendo constatado que todos os ligantes apresentaram valor abaixo de 2Å. Os valores obtidos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Energia de afinidade e RMSD da melhor pose de cada ligante.

Ligantes	ΔG (Kcal/mol)	RMSD*I.b. (Å)
Riparina IV	-7,0	0,198
Lipídio X	-6,9	1,607
Eritoran	-7,1	1,619

**RMSD lower bound.*

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

Para cada ancoragem os tipos de interações, suas distâncias entre os resíduos de aminoácidos da proteína-alvo, assim como, a estrutura química de cada ligante foram verificadas. Os valores podem ser apreciados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados dos testes *in silico*.

Resíduos	RIP IV		LPX		ERI	
	Interação	Distância (Å)	Interação	Distância (Å)	Interação	Distância (Å)
CYS133	Alquil	4,24	Alquil	3,69	Alquil	4,49
			Alquil	4,35	Alquil	5,16
PHE104	π - π em forma T	5,34	π -Alquil	4,04	π -Alquil	4,01
	π -Alquil	3,85	π -Alquil	4,05	π -Alquil	4,16
VAL63	π -Alquil	4,40	Alquil	3,67	Alquil	3,79
			Alquil	4,39	Alquil	4,48
	Alquil	4,08	Alquil	4,66		
PHE76	π - π em forma T	5,45	π -Alquil	5,33	π -Alquil	4,42
VAL61	Alquil	4,86	Alquil	5,09	Alquil	4,34
			Alquil	5,47		
VAL113	Alquil	4,63	Alquil	4,89	Alquil	4,62
PHE65	π -Alquil	5,03	π -Alquil	5,20	π -Alquil	5,14
			π -Alquil	5,34		
ILE117	π -Alquil	5,45	Alquil	4,18	-	-
ILE46	Alquil	3,91	-	-	Alquil	5,37

PHE151	π -Alquil	5,40	-	-	π -Alquil	5,46
	π -Sigma	3,83				
	π - π	4,34				
	Empilhado					
LEU54	-	-	Alquil	4,19		
			Alquil	5,49	Alquil	4,80
TYR131	-	-	π -Sigma	3,78	π -Alquil	4,83
			π -Alquil	4,28		
PHE126	-	-	π -Alquil	5,20	π -Alquil	5,09
ILE80	-	-	Alquil	4,97	Alquil	4,24
					Alquil	4,80
LEU94	-	-	Alquil	4,67	Alquil	4,64
ILE158	-	-	Alquil	3,67		
			Alquil	5,00	-	-
			Alquil	5,29		
PRO118	-	-	-	-	Ligação de hidrogênio	2,36
TYR102	-	-	-	-	Ligação de hidrogênio	2,06
					Ligação de hidrogênio	2,68
LYS263	-	-	-	-	Ligação de hidrogênio	3,38
					Interação positivo-positivo	4,69

desfavorável						
PHE119	-	-	-	-	π -Alquil	4,83
ILE52	-	-	-	-	Alquil	5,41
					Alquil	4,46
ILE153	-	-	-	-	Alquil	4,96
					Alquil	4,91
LEU78	-	-	-	-	Alquil	5,31
LEU87	-	-	-	-	Alquil	5,34
ALA135	-	-	-	-	Alquil	3,84

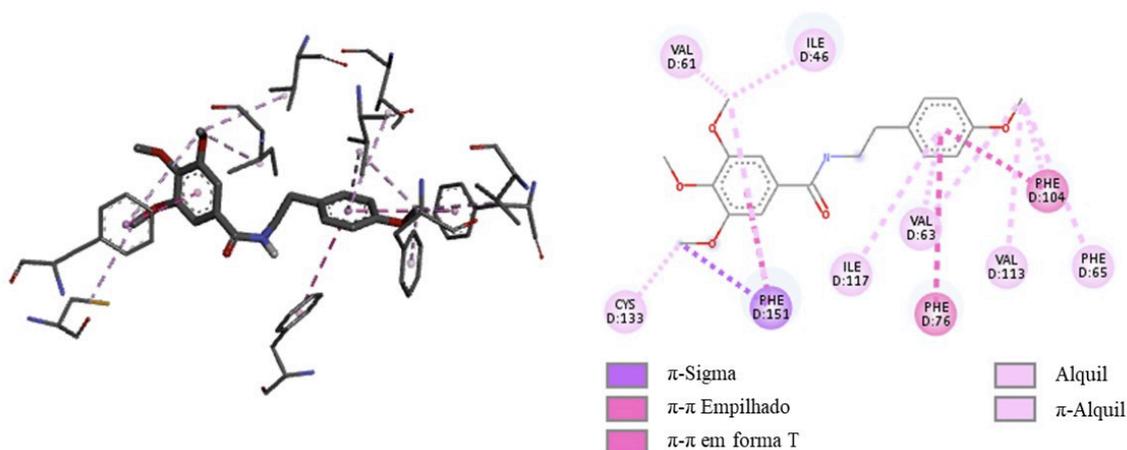
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

Evidencia-se que todos os ligantes interagiram por intermédio de interações hidrofóbicas com os seguintes resíduos: CYS133, PHE104, VAL63, PHE76, VAL61, VAL113 e PHE65. Tanto a RIP IV, como o LPX, possuem interações semelhantes com ILE117, ao passo que a RIP IV e ERI compartilham interações com ILE46 e PHE151. O LPX, em relação ao ERI, interagiu com LEU54, TYR131, PHE126, ILE80 e LEU94. De forma isolada, o LPX apresentou interações com ILE158, o ERI com PRO118, TYR102, LYS263, PHE119, ELE53 e ILE153.

Pôde ser observado que o ERI (análogo do LPX) apresentou, de forma majoritária, interações hidrofóbicas. O mesmo apresentou, também, ligações de hidrogênio com os resíduos PRO118, TYR102 e LYS263, sendo ligações fortes com PRO118 e TYR102 e moderadas LYS263. Quando analisamos a RIP IV e o LPX, evidencia-se apenas interações hidrofóbicas, devido à natureza da cavidade do co-receptor MD-2.

É importante destacar que a RIP IV compartilhou interações com o LPX e/ou com o ERI em diversos resíduos de aminoácidos. A figura 2 mostra os pontos de interação entre a RIP IV e o complexo TLR4/MD-2. Sendo assim, com o intuito de prover uma visualização mais detalhada, os tipos de interações realizadas entre a estrutura química da RIP IV e os resíduos de aminoácidos podem ser observados, na Figura 16, com o mapa 2D das interações.

Figura 16 – Mapa 2D das interações entre a Riparina IV e o TLR4/MD-2.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa.

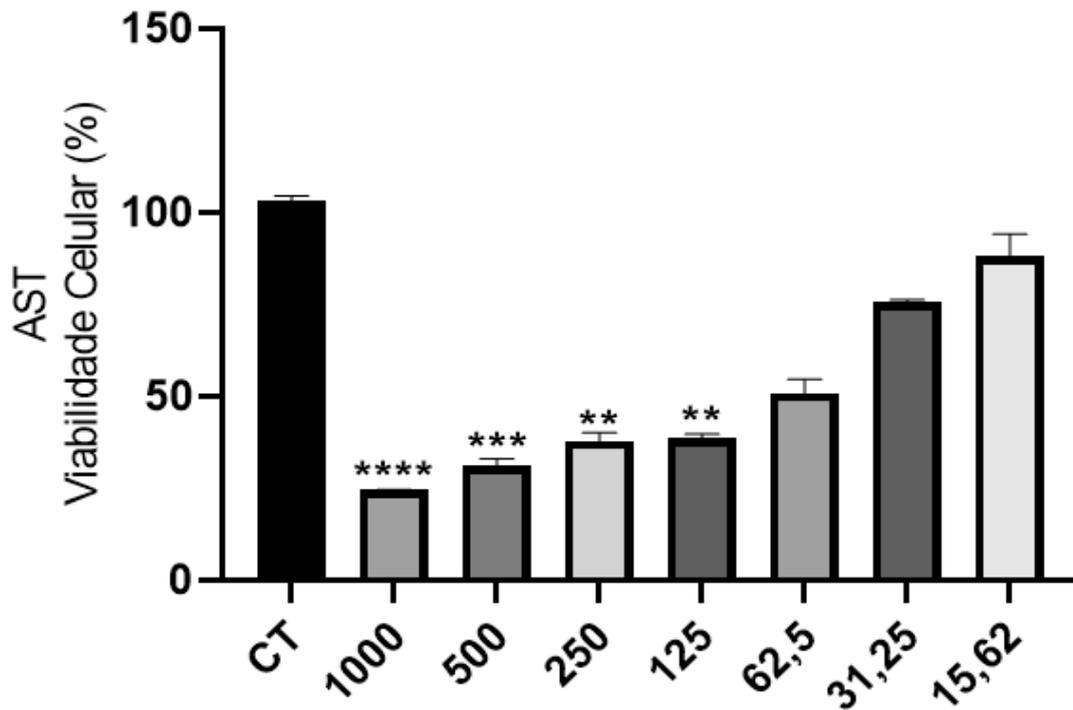
5.2 Testes *in vitro*

5.2.1 Ensaio de Viabilidade Celular

Visando trabalhar com a melhor viabilidade celular, sete concentrações distintas de RIP IV desafiaram AST murinos. As concentrações escolhidas para iniciar foram: 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M e 15,62 μ M. Após análise, foi atestado que as concentrações de **1000 μ M**, **500 μ M**, **250 μ M**, **125 μ M** e **62,5 μ M** apresentaram citotoxicidade significativa, enquanto as demais testadas não. Dados ilustrados na Figura 17 (CT: 103,1 \pm 1,50; 1000: 24,64 \pm 0,07; 500: 31,15 \pm 2,40; 250: 37,83 \pm 2,40; 125: 38,59 \pm 1,27; 62,5: 50,75 \pm 3,90; 31,25: 75,70 \pm 0,62; 15,62: 88,04 \pm 6,18).

Diante dos resultados coletados e visando uma menor citotoxicidade, as concentrações **15,62 μ M**, **7,81 μ M** e **3,90 μ M**, sendo estas inferiores às testadas, foram selecionadas para dar continuidade aos experimentos.

Figura 17 - Avaliação da viabilidade celular da Riparina IV em Astrócitos murinos após 24h de incubação.

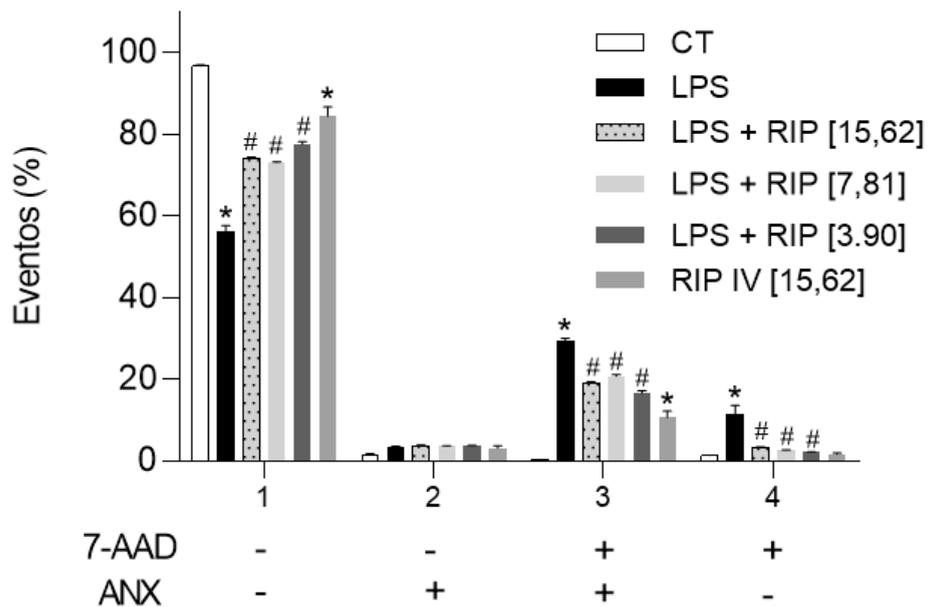


Eixo X representa as concentrações de RIP IV. Os resultados são mostrados como média \pm SEM. Onde $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. Para análise estatística, foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. CT: Controle negativo; Concentrações de RIP IV expressas em números: ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,05$.

5.2.2 Avaliação do Mecanismo de Morte Celular

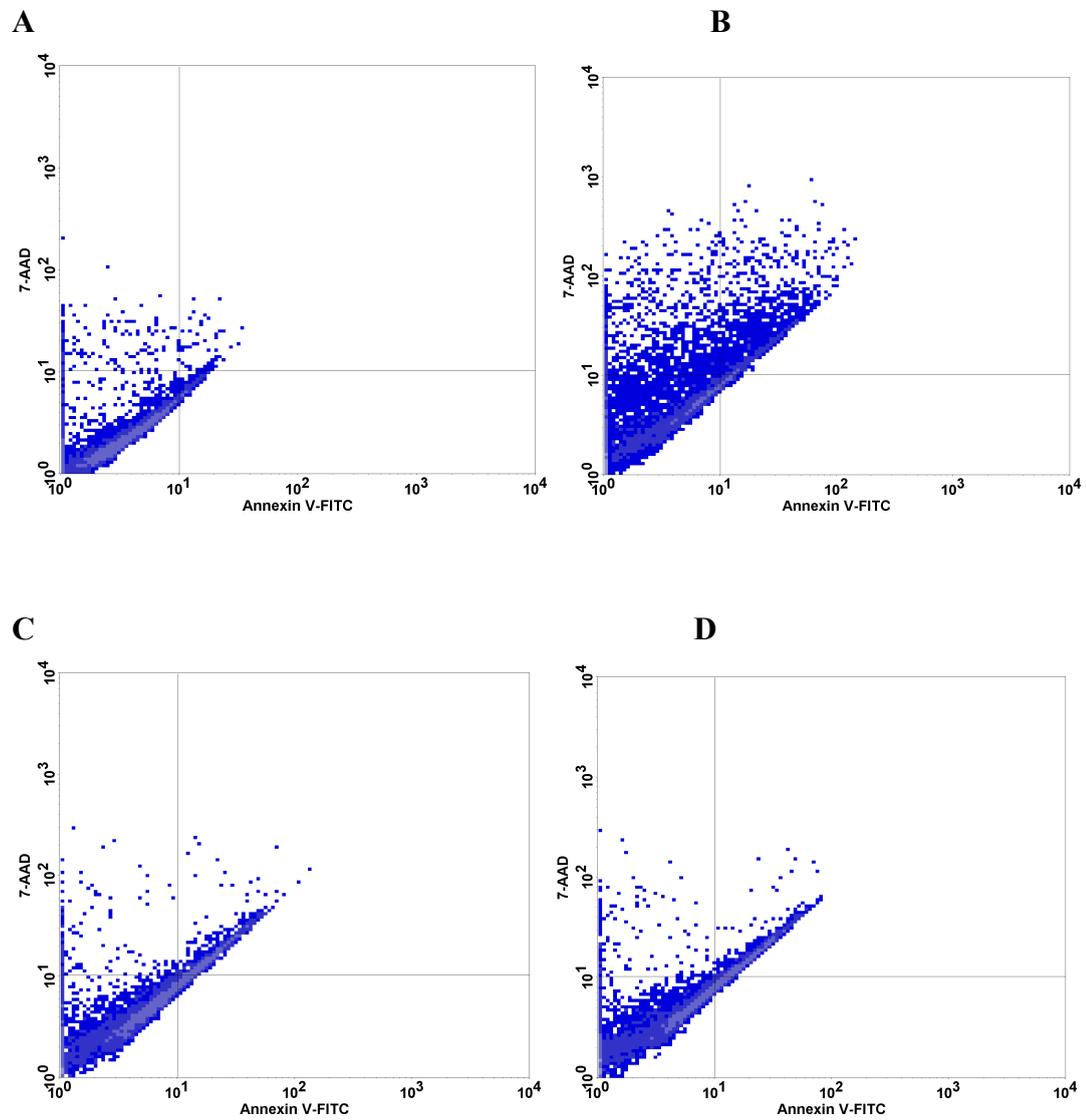
Visando indicar quais os possíveis eventos vinculados ao quadro de morte celular, cujo qual as células sofreram, A Figura 18 nos traz que a RIP IV conseguiu reduzir o quadro de necrose e de apoptose tardia, não sendo significativo no quadro apoptótico. Já os dados apresentados na Figura 18 complementa a Figura 19, demonstrando a densidade celular comparativa de morte celular (CT: $96,66 \pm 0,27$; LPS: $55,92 \pm 1,71$; LPS + 15,62: $73,89 \pm 0,48$; LPS + 7,81: $72,97 \pm 0,25$; LPS + 3,90: $77,53 \pm 0,62$; RIP IV: $84,41 \pm 2,23$).

Figura 18 – Índices de morte celular causada pelo Lipopolissacarídeo e revertido pela Riparina IV em Astrócitos nas concentrações de 15,62 μ M, 7,81 μ M e 3,90 μ M respectivamente, através da marcação com 7-AAD e ANX.



Os resultados são mostrados como média \pm SEM. Os valores estão representados como média \pm EPM, onde (*) $p < 0,05$ vs CT; (#) $p < 0,05$ vs LPS. Para análise estatística, foi utilizado *Two-way* ANOVA, seguido de Dunnett. CT: Controle negativo; LPS: Lipopolissacarídeo; LPS + RIP 15,62: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV na concentração de 15,62 μ M; LPS + RIP 7,81: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV na concentração de 7,81 μ M; LPS + RIP 3,90: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV na concentração de 3,90 μ M

Figura 19 – Gráficos *density plot* representativos da densidade comparativa da avaliação de morte celular.



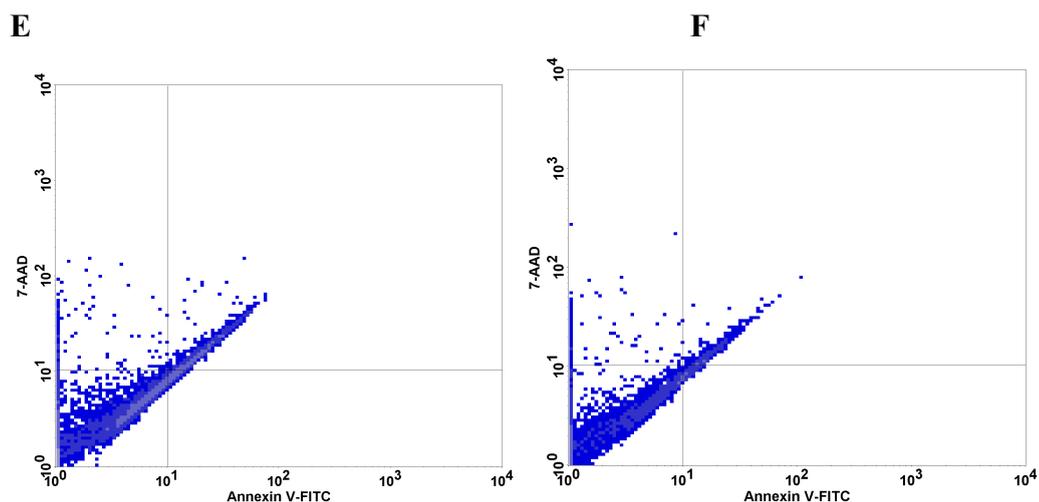


Gráfico [A]: CT; **Gráfico [B]:** LPS; **Gráfico [C]:** LPS + 15,62 μ M; **Gráfico [D]:** LPS + 7,81 μ M; **Gráfico [E]:** LPS + 3,90 μ M; **Gráfico [F]:** RIP IV [15,62 μ M].

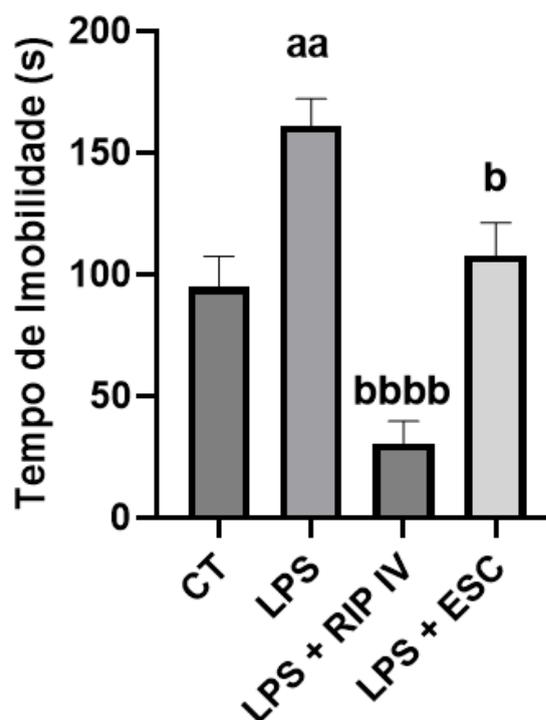
5.3 Testes *in vivo*

5.3.1 Testes comportamentais

5.3.1.1 Nado Forçado

O teste do nado forçado avaliou o tempo de imobilidade dos animais. Na Figura 20 temos que o grupo tratado apenas com LPS apresentou maior tempo de imobilidade frente ao grupo que recebeu apenas salina (CT: $94,78 \pm 12,59$; LPS: $161,0 \pm 14,17$). Quando comparamos o grupo LPS com os demais grupos, evidencia-se a redução do tempo de imobilidade de forma significativa (LPS + RIP IV: $30,55 \pm 9,12$; LPS + ESC: $107,9 \pm 13,42$).

Figura 20 - Efeito da Riparina IV sobre o tempo de imobilidade de animais.

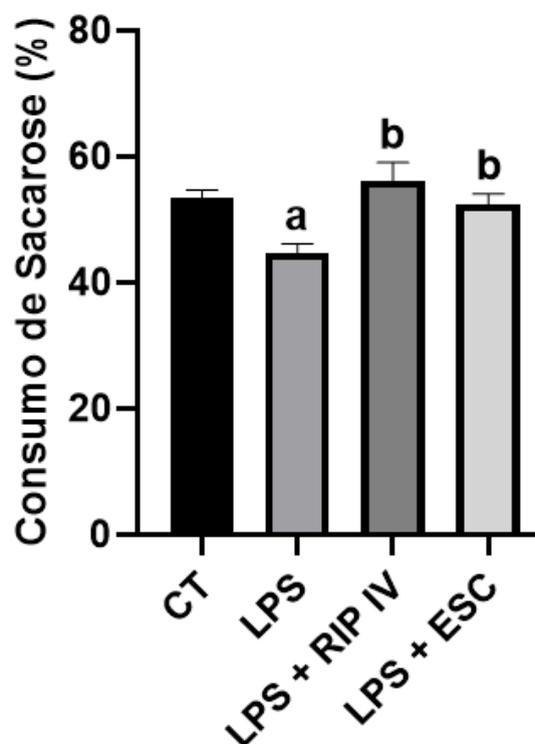


Os animais ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com RIP IV (50mg/kg) ou ESC (10mg/kg). Os valores estão representados como média \pm EPM, onde **(a)** $p < 0,01$ vs CT; **(b)** $p < 0,05$, **(bbbb)** $p < 0,0001$ vs LPS. Teste utilizado: One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Grupo controle sem exposição ao LPS ou drogas teste; LPS: Grupo exposto ao LPS; LPS + RIP IV: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV; ESC: Grupo exposto ao LPS e tratado com ESC.

5.3.1.2 Preferência pela Sacarose

O teste da preferência pela sacarose avaliou o consumo de solução de sacarose pelos animais do presente estudo. Como ilustra a Figura 21, o grupo LPS, em relação ao grupo CT, obteve um consumo inferior de sacarose, indicando a possível presença de comportamento anedônico (CT: $53,53 \pm 1,19$; LPS: $44,70 \pm 1,45$). Comparando o grupo LPS com os demais, é possível observar um aumento significativo do consumo de sacarose por parte do grupo LPS + RIP IV e LPS + ESC (LPS + RIP IV: $56,23 \pm 2,86$; LPS + ESC: $52,45 \pm 1,62$).

Figura 21 - Efeito da Riparina IV frente o consumo de sacarose em animais.



Os animais ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com RIP IV (50mg/kg), ESC (10mg/kg). Os valores estão representados como média \pm EPM, onde **(a)** $p < 0,05$ vs CT; **(b)** $p < 0,05$ vs LPS. Teste utilizado: One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Grupo controle sem exposição ao LPS ou drogas teste; LPS: Grupo exposto ao LPS; LPS + RIP IV: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV; ESC: Grupo exposto ao LPS e tratado com ESC;

5.3.1.3 *Splash*

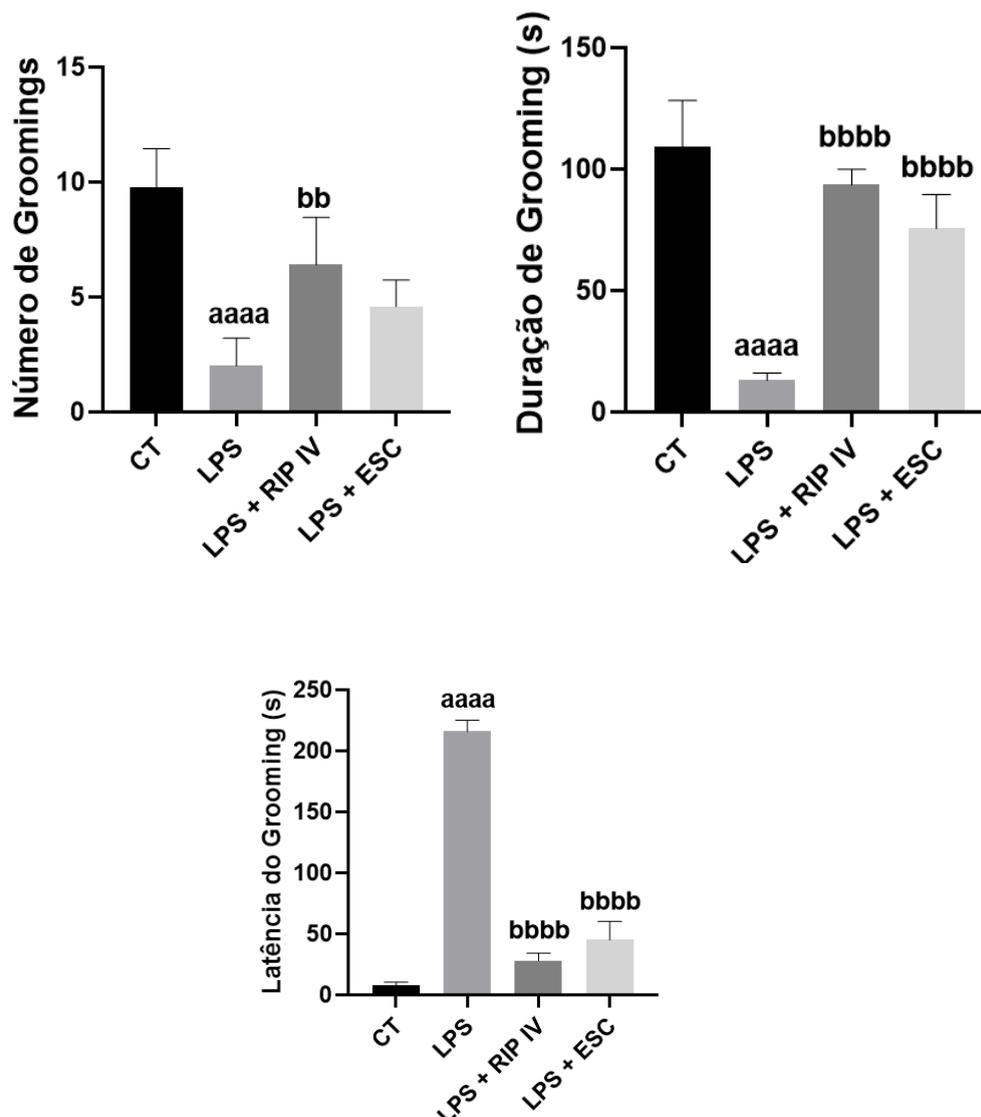
O teste em questão visa avaliar o comportamento de autolimpeza do animal, por intermédio do *grooming*, ao receber respingos de solução de sacarose em sua pelagem. Três fatores foram levados em consideração para a avaliação: o número de vezes que o animal executou o *grooming*, a latência e duração do mesmo.

Em relação ao número de *groomings*, na Figura 22 pode-se observar que o grupo LPS os reduziu de forma significativa quando comparado com o grupo CT, ao passo que, com significância, o grupo tratado com RIP IV aumentou o comportamento de autolimpeza quando comparado ao grupo exposto, apenas, ao LPS (CT: $9,75 \pm 0,85$; LPS: $2,00 \pm 0,54$; LPS + RIP IV: $6,40 \pm 0,92$; LPS + ESC: $4,60 \pm 0,50$).

Na figura supracitada é possível observar, também, a duração de cada *grooming* apresentado pelos animais. Na ocasião, o grupo exposto apenas ao LPS apresentou curta duração de movimentos de autolimpeza (s) em comparação ao grupo CT. Tanto os grupos tratados com RIP IV e ESC obtiveram um durações maiores de *grooming* frente ao grupo LPS (CT: $109,0 \pm 9,65$; LPS: $13,00 \pm 1,37$; LPS + RIP IV: $93,60$; LPS + ESC: $75,60 \pm 6,23$).

No que diz respeito à latência entre os *groomings*, o grupo exposto apenas ao LPS apresentou alta latência entre um *grooming* e outro, quando comparado ao grupo CT. Já o grupo tratado com RIP IV e ESC reduziram significativamente a latência em comparação com o grupo LPS (CT: $7,50 \pm 1,55$; LPS: $216,0 \pm 4,03$; LPS + RIP IV: $28,20 \pm 2,72$; $45,00 \pm 6,83$).

Figura 22 - Efeito da Riparina IV frente ao número, duração e latência dos *groomings* realizados por animais.

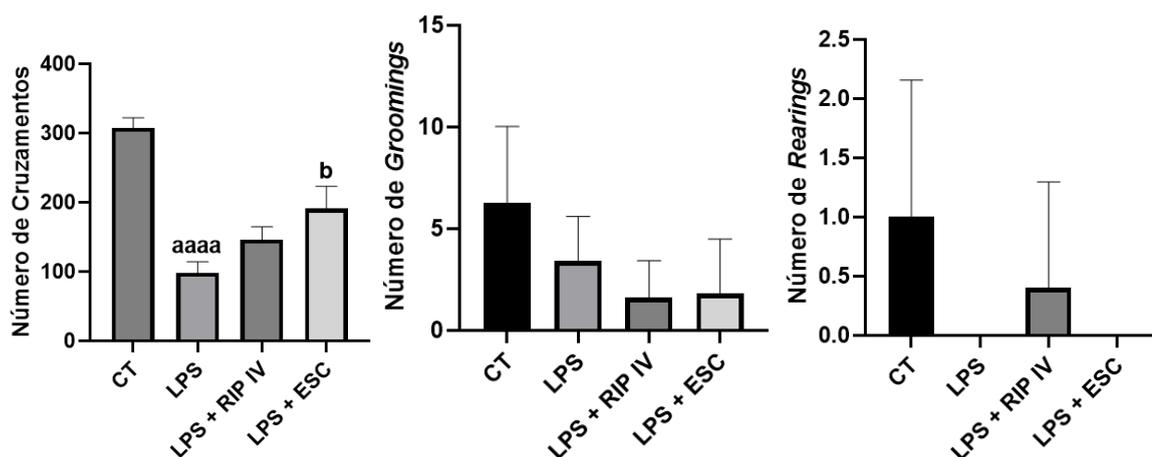


Os animais (n = 8 - 10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com RIP IV (50mg/kg), ESC (10mg/kg). Os valores estão representados como média ± EPM, onde (**aaaa**) p < 0,0001 vs CT; (**bb**) p < 0,001, (**bbbb**) p < 0,0001 vs LPS. Teste utilizado: One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Grupo controle sem exposição ao LPS ou drogas teste; LPS: Grupo exposto ao LPS; LPS + RIP IV: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV; ESC: Grupo exposto ao LPS e tratado com ESC.

5.3.1.4 Campo Aberto

O teste do campo aberto avaliou o comportamento de locomoção e exploração dos animais em um ambiente inexplorado anteriormente pelos mesmos, onde pôde ser analisado o número de *crossings* (cruzamentos), *rearings* e *groomings*. No número de cruzamentos, como expresso na Figura 23, foram reduzidos pelo grupo LPS quando comparado ao grupo CT. Em contrapartida, o grupo exposto ao LPS, mas tratado com ESC, obteve um número maior de cruzamentos quando comparado ao grupo LPS, demonstrando resultados significativos. Já a RIP IV apresentou apenas uma tendência em aumentar a atividade exploratória quando comparada ao grupo LPS. Não houveram dados significativos na análise do número de *groomings* ou *rearings* (CT: 307,9 ± 14,41; LPS: 98,50 ± 15,79; LPS + RIP IV: 146,3 ± 18,71; LPS + ESC: 191,0 ± 32,23).

Figura 23 - Efeito da Riparina IV frente ao número de cruzamentos, *groomings* e *rearings*.



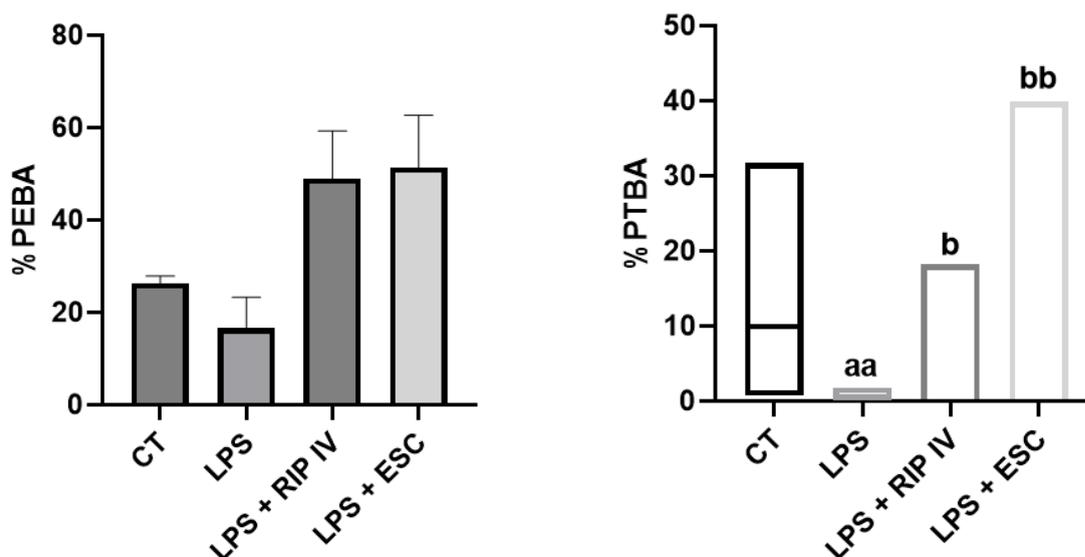
Os animais (n = 8 - 10 animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com RIP IV (50mg/kg), ESC (10mg/kg). Os valores estão representados como média ± EPM, onde (**aaaa**) p < 0,0001 vs CT; (**b**) p < 0,05 vs LPS. Teste utilizado: One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Grupo controle sem

exposição ao LPS ou drogas teste; LPS: Grupo exposto ao LPS; LPS + RIP IV: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV; ESC: Grupo exposto ao LPS e tratado com ESC.

5.3.1.5 Plus Maze

Os dados apresentados na Figura 24, representam os resultados do teste *plus maze*, onde os animais demonstraram poucas entradas nos braços abertos, porém, enquanto no interior dos mesmos, assim permaneceram. O número de entradas não obteve significância em nenhum dos grupos, porém o grupo LPS, em comparação com CT, permaneceu menos tempo nos braços abertos. Já o grupo tratado com RIP IV e ESC reverteram este comportamento, permanecendo mais tempo na região aberta do aparato (CT: $9,87 \pm 3,48$; LPS: $0,61 \pm 0,25$; LPS + RIP IV: $18,23 \pm 11,92$; LPS + ESC: $39,85 \pm 17,18$).

Figura 24 - Efeito da Riparina IV frente ao PTBA e PEBA.

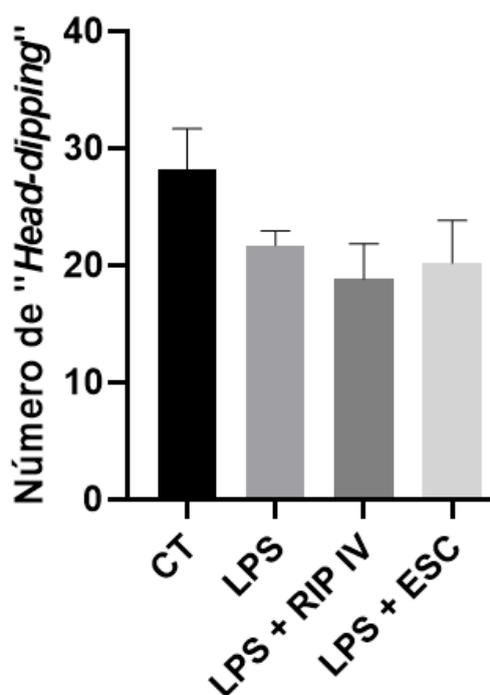


Os animais ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com RIP IV (50mg/kg), ESC (10mg/kg). Os valores estão representados como média \pm EPM, onde **(aa)** $p < 0,01$ vs CT; **(b)** $p < 0,05$ vs LPS, **(bb)** $p < 0,005$ vs LPS. Teste utilizado: Kruskal-Wallis, seguido de Dunn (*post hoc*). CT: Grupo controle sem exposição ao LPS ou drogas teste; LPS: Grupo exposto ao LPS; LPS + RIP IV: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV; ESC: Grupo exposto ao LPS e tratado com ESC.

5.3.1.6 Placa Perfurada

No teste da placa perfurada, a atividade exploratória e a ansiedade dos animais é avaliada por meio de mergulhos dentro dos orifícios presentes no aparato. Cada mergulho é chamado de "head-dip". Dentro deste parâmetro não houveram dados significantes apresentados pelos animais. O que pode-se notar seria a possibilidade de uma tendência frente ao grupo LPS em reduzir a quantidade de "head-dips" quando comparado ao grupo CT, porém os grupos tratados não reverterem, nem de forma tendenciosa, tal comportamento, como apresentado na Figura 25 (CT: $28,17 \pm 3,51$; LPS: $21,71 \pm 1,22$; LPS + RIP IV: $18,86 \pm 3,00$; LPS + ESC: $20,23 \pm 3,62$).

Figura 25 - Efeito da Riparina IV em relação ao número de "head-dips" .

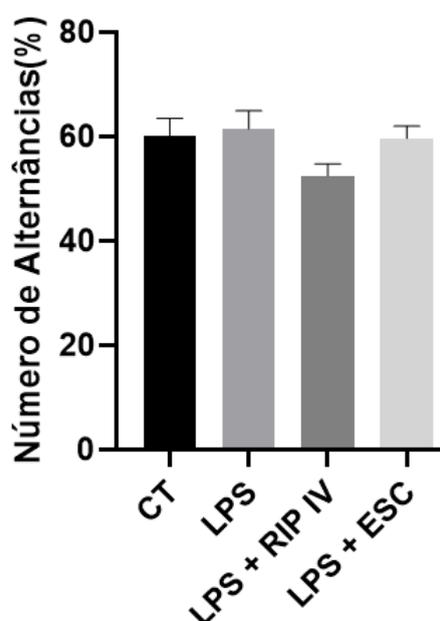


Os animais ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com RIP IV (50mg/kg), ESC (10mg/kg). Os valores estão representados como média \pm EPM. Teste utilizado: One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Grupo controle sem exposição ao LPS ou drogas teste; LPS: Grupo exposto ao LPS; LPS + RIP IV: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV; ESC: Grupo exposto ao LPS e tratado com ESC.

5.3.1.7 Y-Maze

Em avaliação da memória curta dos animais submetidos ao modelo proposto utilizando LPS, não houveram valores significativos em nenhum dos grupos testados. Não havendo, portanto, variações frente aos parâmetros avaliados. Dados estes apresentados na Figura 26 (CT: $60,08 \pm 3,39$; LPS: $61,47 \pm 3,50$; LPS + RIP IV: $52,52 \pm 2,27$; LPS + ESC: $59,73 \pm 2,32$).

Figura 26 - Efeito da Riparina IV em relação ao número de alternâncias realizadas pelos animais submetidos ao modelo de LPS avaliados pelo teste do *Y-Maze*.



Os animais ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foram submetidos a exposição ao LPS durante 10 dias. A partir do 6º dia foram tratados com RIP IV (50mg/kg), ESC (10mg/kg). Os valores estão representados como média \pm EPM. Teste utilizado: One-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*). CT: Grupo controle sem exposição ao LPS ou drogas teste; LPS: Grupo exposto ao LPS; LPS + RIP IV: Grupo exposto ao LPS e tratado com RIP IV; ESC: Grupo exposto ao LPS e tratado com ESC.

6 Discussão

À luz da literatura, o quadro de neuroinflamação pode desempenhar um papel importante no início do quadro depressivo (Kruse *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2024). Este fato é fundamentado em evidências empíricas indicando que a administração de LPS pode, de forma direta, desencadear o quadro de neuroinflamação e induzir comportamentos do tipo depressão-símile tanto em camundongos como em ratos, alterando o quadro da maioria dos parâmetros comportamentais preditivos tanto de ansiedade como de depressão (Silva *et al.*, 2024).

É sabido que a RIP IV possui efeitos antidepressivos, sendo estes catalogados em outros modelos animais de depressão, como por exemplo, modelos que utilizam a corticosterona para induzir o quadro depressivo (Chaves *et al.*, 2020). Porém, a depressão é uma doença de quadro multifatorial, apresentando alterações neurobiológicas no metabolismo de monoaminas, na neurogênese, nas citocinas e, também, dos níveis de estresse oxidativo (Mallmann *et al.*, 2021; Ge *et al.*, 2024). Sendo assim, fica evidente a necessidade de uma droga que atue de maneira plural, visando a melhor resposta clínica do indivíduo.

Segundo Kumar e colaboradores (2024), o *docking* molecular tem sido cada vez mais importante como técnica de descoberta de medicamentos ao longo do tempo. Logo buscou-se verificar, *a priori*, a possibilidade de interação entre a molécula da RIP IV e a via neuroinflamatória.

Embora o LPS ative a via de sinalização do TLR4, o seu nível de expressão e a ativação dependem do complexo formado por sua proteína auxiliar, a MD-2 (Zheng, *et al.*, 2024). Logo, evidenciar a inter-relação entre a RIP IV e tal proteína torna-se crucial.

A RIP IV apresentou dez interações em comum com o LPX e com o ERI. O ERI é um dos inibidores de TLR4 mais potentes, tendo sua atividade associada à sua capacidade de competir como LPS pela ligação ao MD-2. De forma semelhante, os compostos FP-13, FP-14, FP-15, FP-16 e FP-17 (FP13-17), projetados de forma mimética ao lipídio A, ligam-se ao MD-2 com afinidades semelhantes. Estas ligações causam a inibição da via sinalizadora do TLR4, estimulada por LPS, em células humanas e murinas. Em particular, descobriu-se que o resíduo PHE151 interage com a porção insaturada dos ácidos oleico e linoleico nos compostos FP13-17, enquanto outras interações hidrofóbicas foram encontradas com as cadeias laterais dos resíduos PHE121, PHE147, ILE44 e ILE46 (Cochet, *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2022).

Vale ressaltar que a capacidade de ancoragem de cada ligante depende do número e, principalmente, do tipo de interação realizada com a proteína-alvo. As ligações do tipo hidrogênio se apresentam como as interações intermoleculares de maior força de afinidade. Esta intensidade, por sua vez, pode ser estratificada levando em consideração a distância entre os átomos doadores e aceptores, podendo ser classificadas como fortes quando a distância está entre 2,5-3,1 Å, moderada entre 3,1-3,55 Å e fraca quando maior que 3,55 Å (Imberty *et al.*, 1991).

No presente estudo foi constatado que a RIP IV apresentou interações pertinentes nos resíduos ILE46 e PHE151, sendo estes alvos importantes dos compostos inibitórios (FP13-17 e ERI) via MD-2. No caso do resíduo PHE151, a RIP IV apresentou três interações, ao passo que o ERI apenas uma. Dentro destas três interações, uma delas (3,83Å | π -Sigma) é considerada mais forte frente a observada pelo ERI (5,46Å | π -Alquil). O mesmo acontece com a porção ILE46 (RIP IV: 3,91Å; ERI: 5,37Å).

Diante destas similaridades, pode-se entender que várias das porções onde os inibidores da MD-2 interagem a RIP IV também apresentou afinidade, logo, assim como o ERI e FP13-17, podemos afirmar que existe uma possibilidade de inibição da sinalização via LPS-MD2-TLR4. Porém tal probabilidade necessita ser elucidada com outras metodologias complementares.

Visando corroborar com os dados encontrados nos testes *in silico*, torna-se necessário fazer um *link* entre os efeitos da RIP IV na depressão/neuroinflamação no presente estudo. Uma das maneiras de se avaliar o quadro depressivo se dá pela utilização de modelos animais, por meio da avaliação comportamental. O teste do nado forçado possui grande destaque neste cenário, uma vez que é visível seu amplo uso na literatura como teste de triagem pré-clínica, para potenciais novos antidepressivos. Trata-se de um teste simples e de fácil condução, tornando mais fácil a interpretação e a comparação entre diferentes estudos (Moreno *et al.*, 2016; Sartori *et al.*, 2020; Nadeau *et al.*, 2022).

Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa, quando comparamos o grupo CT com o grupo LPS, fica evidente o aumento do tempo de imobilidade dentre os animais que foram expostos ao LPS. O comportamento de imobilidade é indicativo de comportamento depressivo (Zhou *et al.*, 2024). Comportamento, este, reduzido de forma significativa quando comparado com os animais tratados com RIP IV. Estes resultados se alinham com os de Chaves e colaboradores (2019), onde a mesma, em um outro modelo animal, atesta o efeito antidepressivo da RIP IV no nado forçado, tendo apresentado também uma redução do tempo de imobilidade no grupo tratado.

O ESC, derivado do racemato de citalopram, é o inibidor seletivo da recaptção de serotonina que apresenta a maior seletividade farmacológica quando comparado com seus pares. Tendo sido aprovado pela FDA dos Estados Unidos para o tratamento da depressão desde 2004. Vários são os estudos em animais que o trazem como tratamento padrão controlado devido a sua excelente eficácia, sendo ele um dos mais utilizados no teste do nado forçado (Brandwein *et al.*, 2023; Shi *et al.*, 2023; Pan *et al.*, 2024). Em linha com tais estudos, o ESC, de forma significativa, reduziu o tempo de imobilidade dos animais que o receberam como tratamento, em comparação com grupo exposto, apenas, ao LPS.

A anedonia é um sintoma prevalente na depressão. A investigação experimental da anedonia em roedores oferece percepções valiosas sobre os mecanismos neurobiológicos subjacentes à depressão, auxiliando no desenvolvimento de intervenções e tratamentos eficazes (Curi, *et al.*, 2021; Ferreira, *et al.*, 2024). Estudos recentes, com modelos de LPS, associam o quadro de neuroinflamação com o comportamento anedônico, o correlacionando com células neuronais, como AST (Diaz-Castro *et al.*, 2021). A literatura aponta, também, a ação positiva do ESC frente ao tratamento da anedonia onde Burstein e colaboradores (2017) atestaram que camundongos estressados tratados com escitalopram mostraram maior preferência por sacarose em comparação com os camundongos estressados.

Logo, fica evidente a ação da RIP IV na redução do comportamento anedônico, podendo ser comparada, neste teste comportamental, com o ESC em termos de atividade.

Humor deprimido, anedonia, falta de motivação e autocuidado são sintomas comumente observados em pacientes deprimidos (Kennedy, 2008; Tomaz *et al.*, 2020). Tendo a RIP IV sido eficaz em melhorar o comportamento de autocuidado, tendo como base os dados obtidos com o teste do *splash*, foi observado, não só um aumento na duração do *grooming*, mas uma diminuição da latência do mesmo. Uma vez que RIP IV apresentou efeito significativo na reversão dos comportamentos tipo anedônico, depressivo e de autocuidado, pode-se inferir que os animais tratados RIP IV tiveram uma redução significativa em três dos sintomas mais importantes do quadro depressivo. Cabe destacar que o ESC é escolhido como controle positivo em diversos estudos, inclusive no teste do *splash* (Abelaira *et al.*, 2022; Peña *et al.*, 2024). Já no presente estudo, evidencia-se uma superioridade no número de *groomings* realizados pelo grupo LPS + RIP IV frente ao grupo LPS + ESC, demonstrando um possível melhor efeito da RIP IV em relação a uma das drogas mais utilizadas no campo experimental.

O *grooming* também foi avaliado em outro teste comportamental, o campo aberto. O teste avalia a atividade locomotora, hiperatividade e hipoatividade, além de comportamentos

exploratórios. Porém o teste também é usado para medir a ansiedade, uma vez que os roedores tendem a evitar espaços abertos, novos e iluminados de forma intensa, portanto, o ambiente de campo aberto atua como um estímulo ansiogênico. Ele permite a medição da atividade locomotora induzida pela ansiedade e dos comportamentos exploratórios (Seibenhener; Wooten, 2015; Thum *et al.*, 2024)

Reduções na atividade ou locomoção são sintomas comuns de fadiga em modelos humanos e animais e são uma resposta comportamental típica decorrente do "comportamento de doença" causado pela ativação imunológica (Foster *et al.*, 2021). Em linha com a literatura apresentada, os resultados do presente trabalho demonstram que o grupo exposto apenas ao LPS teve o número de cruzamentos inferior ao grupo controle, assim como o número de *rearings*, podendo indicar tanto um comportamento de resposta a um processo inflamatório, como um estímulo ansiogênico.

Pode-se observar que os animais submetidos a outros testes comportamentais do presente estudo, como o nado forçado, preferência pela sacarose e *splash* se mostraram depressivos quando expostos ao LPS. Assim, parece plausível afirmar que os animais submetidos ao mesmo protocolo com LPS e avaliados pelo teste do campo aberto, apresentem comportamento de ansiedade, evitando explorar o aparato. O número de *groomings*, um comportamento característico de limpeza (Branchi; Alleva, 2006; Silva *et al.* 2024), não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Porém o comportamento de *grooming* pode aumentar quando o animal está calmo ou ansioso. Devido aos seus significados paradoxais, o mesmo não pode ser usado isoladamente como um indicador de ansiedade (Silveira *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2024). É notório, apenas, uma tendência da RIP IV aumentar o número de cruzamentos, reduzir o número de *groomings* e melhorar a atividade exploratória com o número de *rearings*, porém, em nenhum dos parâmetros avaliados a mesma demonstrou significância.

Buscando corroborar com a atividade ansiolítica da RIP IV, o teste do *Plus Maze* e da placa perfurada foram realizados. Os testes são amplamente utilizados para ensaio comportamental em roedores, tendo sido validados para avaliar os efeitos anti-ansiedade de vários agentes farmacológicos e de comportamento subjacente relacionado à ansiedade. No aparato *Plus Maze*, os agentes que revertem o comportamento ansioso exibem um aumento na porcentagem de preferência por braços abertos, o número de entradas e o tempo gasto em braços abertos. Já o LPS induz comportamento ansioso tanto neste teste como na placa perfurada, fato evidenciado por vários outros trabalhos (Swiergiel; Dunn, 2007; Rico *et al.*, 2010; Shahzad *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2017, Sun *et al.*, 2024).

A presente pesquisa traz que os animais submetidos a avaliação do *Plus Maze*, expostos apenas ao LPS permaneceram menos tempo nos braços abertos em comparação ao grupo CT. Ao passo, que os animais tratados com RIP IV e ESC apresentaram-se de forma menos ansiosa, ao passarem mais tempo nos braços abertos do aparato.

A placa perfurada, por sua vez, avalia padrões ansiogênicos buscando medir a resposta de um animal a um ambiente desconhecido. Este teste tem sido usado para examinar os efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos, como o diazepam (Takeda; Tsuji; Matsumiya, 1998; Matsumoto *et al.*, 2021).

Não houveram alterações significativas frente a avaliação da ansiedade dos animais pelo aparato da placa perfurada, porém todos os testes realizados anteriormente no presente trabalho apontam para um possível efeito antidepressivo e ansiolítico, por parte da RIP IV, corroborando com outros autores (Chaves *et al.*, 2020; Sartori *et al.*, 2020).

No teste do *Y Maze* o nível de desempenho de memória de trabalho dos animais é avaliado observando e medindo o comportamento de alternância espontânea do animal (Alam; Krishnamurthy, 2022). A literatura mostra que a neuroinflamação induzida por LPS aumenta a depressão, podendo diminuir o índice de reconhecimento, com possibilidade de redução da memória de trabalho ao diminuir os níveis de expressão de BDNF no hipocampo (Sohroforouzani *et al.*, 2022). Esta redução da memória não foi observada nos resultados do presente estudo, não havendo significância entre os valores obtidos.

Uma das células mais importantes na produção de BDNF, citado anteriormente, é o AST. Entre suas várias funções, os AST sintetizam, liberam e reabsorvem fatores tróficos, incluindo neurotrofinas (como o BDNF). Estudos iniciais focaram principalmente no NGF derivado de AST, porém dados mais recentes têm apontado a presença do BDNF derivado de AST (Albini; Krawczun-Rygmazewska; Cesca, 2022). Os AST possuem relação com LPS no quadro de depressão, participando de forma importante em condições patológicas no SNC, sendo cruciais na regulação da resposta neuroinflamatória (Sohroforouzani *et al.*, 2022; Yue *et al.*, 2022).

Cabe aqui ressaltar que a microglia também desempenha um papel essencial na neuroinflamação, porém, como as células gliais mais abundantes no SNC, o papel dos AST na mediação e regulação da neuroinflamação não pode ser negligenciado (Brambilla *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2021)

Os AST podem aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Tais fatores recrutam leucócitos e ativam tanto AST como microglia vizinhos, resultando em uma amplificação inflamatória. Logo a supressão da atividade inflamatória de

AST tem se tornado promissora visando o tratamento de doenças relacionadas com a neuroinflamação (Lu *et al.*, 2021).

A RIP IV apresentou, no presente trabalho, similaridade de encaixe com o ERI em testes *in silico*, podendo sinalizar a possibilidade de inibição da sinalização via TLR4/MD-2. Logo, a inativação de AST, desta forma, pode ser um meio de inibir a ação neuroinflamatória.

Diante do pressuposto, uma vez que os fármacos antidepressivos utilizados na prática clínica apresentam citotoxicidade comprovada, como já citado anteriormente, elucidar se a RIP IV apresenta tal citotoxicidade/citoproteção é de suma importância para averiguar uma possível vantagem entre os fármacos disponíveis no mercado.

Para avaliar os padrões citoprotetores e citotóxicos da RIP IV, testes de viabilidade celular foram realizados com diversas concentrações de RIP IV em AST murinos. A literatura nos traz que, na presença do LPS, são verificadas alterações morfológicas em AST, demonstrando aumento de volume dos corpos celulares, o que pode ser indicativo de lesão (Xingi *et al.*, 2023). Os dados do presente trabalho corroboram com os achados acima citados, uma vez que as células expostas ao LPS, foram marcadas com 7-AAD, podendo ser indicativo de necrose. Ao passo que todas as concentrações de RIP IV (15,62; 7,81 e 3,90) reduziram a marcação com 7-AAD das células expostas ao LPS, evidenciando um efeito citoprotetor.

Em análise dos eventos apoptóticos, a externalização de fosfatidilserina trata-se de um evento precoce da apoptose, podendo ser relacionada ao reconhecimento por fagócitos e consequente remoção de corpos apoptóticos do tecido. Tal evento é marcado pela ANX que, na presença de íons cálcio, liga-se à fosfatidilserina (Kim *et al.*, 2020; Magalhães *et al.*, 2022). Analisando os resultados encontrados, não houveram eventos apoptóticos significativos, indicando que o LPS provavelmente atue de forma necrótica na célula em estudo.

Tendo como resultado positivo, a RIP IV apresentou-se como uma molécula antidepressiva, citoprotetora e com baixa toxicidade celular. É importante salientar que mais testes necessitam ser feitos para prover maior robustez com os dados aqui apresentados, porém o presente trabalho demonstra uma molécula promissora antidepressiva com viabilidade correlacionada *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

7 Conclusão

A busca por inovações no tratamento farmacológico da depressão deve ser incessante. Novas terapêuticas com melhor eficácia e menos efeitos adversos devem ser buscadas. Diante do supracitado, o presente estudo buscou avaliar os efeitos da RIP IV frente a sua capacidade antidepressiva e citoprotetora atuando pela hipótese neuroinflamatória da depressão. Nos testes *in silico* a RIP IV apresentou encaixes semelhantes tanto ao agonista LPX, como ao antagonista ERI, podendo indicar uma possibilidade de interação importante com a proteína MD-2. Sendo proteína MD-2 crucial para a ativação da cascata inflamatória astrocitária via TLR4, a inativação da mesma parece ser um alvo interessante para RIP IV. Novos estudos correlacionando a RIP IV com a via neuroinflamatória astrocitária devem ser encorajados, uma vez que ela apresentou baixa citotoxicidade quando comparada ao LPS, características estas que alguns antidepressivos não possuem. Nos testes comportamentais, sua atividade antidepressiva e ansiolítica pôde ser atestada e replicada quando a comparamos com outros trabalhos na literatura. Fazem-se necessários mais testes visando elucidar, de forma aprofundada, mecanismos de ação, interações importantes e a translação para humanos. Diante do pressuposto, é possível afirmar que a RIP IV mostrou-se promissora como uma potente candidata para auxiliar futuramente os pacientes que carregam o estigma da depressão.

8 Referências Bibliográficas

ABELAIRA, H. M. *et al.* Combination of electroconvulsive stimulation with ketamine or escitalopram protects the brain against inflammation and oxidative stress induced by maternal deprivation and is critical for associated behaviors in male and female rats. **Molecular neurobiology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 1452–1475, 2022.

ALAM, Q.; SAIRAM 2. Dihydroquercetin ameliorates LPS-induced neuroinflammation and memory deficit. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, [s. l.], v. 3, p. 100091, 2022.

ALBINI, M.; KRAWCZUN-RYGMACZEWSKA, A.; CESCO, F. Astrocytes and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 197, p. 42–51, 2023.

ANACKER, C. *et al.* The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 415–425, 2011.

ARAÚJO, F. L. O. DE. **Estudo dos efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de (O-Metil)-N-Benzoil Tiramina (Riparina I) de Aniba Riparia (Nees) Mez (Lauraceae) em camundongos.** 2007.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.

BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.

BRAMBILLA, R. *et al.* Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 145–156, 2005.

BRANCHI, I.; ALLEVA, E. Communal nesting, an early social enrichment, increases the adult anxiety-like response and shapes the role of social context in modulating the emotional behavior. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 299–306, 2006.

BRANDWEIN, C. *et al.* A systematic mapping review of the evolution of the rat Forced Swim Test: Protocols and outcome parameters. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 196, p. 106917, 2023.

BURSTEIN, O. *et al.* Escitalopram and NHT normalized stress-induced anhedonia and molecular neuroadaptations in a mouse model of depression. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. e0188043, 2017.

CAO, C. *et al.* Prevalence, correlates and misperception of depression symptoms in the United States, NHANES 2015–2018. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 269, p. 51–57, 2020.

CAPIBARIBE, V. C. C. *et al.* Thymol reverses depression-like behaviour and upregulates hippocampal BDNF levels in chronic corticosterone-induced depression model in female mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 71, n. 12, p. 1774–1783, 2019.

CARTIER, N. *et al.* The role of microglia in human disease: Therapeutic tool or target?. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 128, n. 3, p. 363–380, 2014.

CHAVES, R. de C. *et al.* Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 180, p. 44–51, 2019.

CHAVES, R. de C. *et al.* The neuroprotective effect of Riparin IV on oxidative stress and neuroinflammation related to chronic stress-induced cognitive impairment. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 122, p. 104758, 2020.

CHEN, L. *et al.* Recent progress in the discovery of myeloid differentiation 2 (MD2) modulators for inflammatory diseases. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 6, p. 1187–1202, 1 jun. 2018.

CLARK, G.; KOESTER, A. G.; PEARSON, D. W. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. **Psychopharmacologia**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 169–171, 1971.

COCHET, F. *et al.* Novel carboxylate-based glycolipids: TLR4 antagonism, MD-2 binding and self-assembly properties. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.

CODELUPPI, S. *et al.* Prefrontal Cortex Astroglia Modulate Anhedonia-like Behavior. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-3093428/latest>.

CURI, H. T. *et al.* Maternal high-fat diet increases anhedonic behavior and modulates hippocampal Mash1 and BDNF expression in adult offspring. **Neuroscience letters**, [s. l.], v. 764, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34509569/>.

CUSSON-HERMANCE, N. *et al.* Rip1 Mediates the Trif-dependent Toll-like Receptor 3- and 4-induced NF- κ B Activation but Does Not Contribute to Interferon Regulatory Factor 3 Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 36560–36566, 4 nov. 2005.

CZÉH, B.; BARBARA 20. Antidepressants act directly on astrocytes: Evidences and functional consequences. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 171–185, 2013.

DAI, W. *et al.* Natural products for the treatment of stress-induced depression: Pharmacology, mechanism and traditional use. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 285, p. 114692, 2022.

DALL'IGNA, O. P. *et al.* Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 203, n. 1, p. 241–245, 2007.

DANG, R. *et al.* ω -3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and modulates neurotrophic factors in rats: Focus on tPA/PAI-1 system and BDNF-TrkB signaling. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 30, p. 74–80, 2017.

DAVID, D. J.; GOURION, D. Antidépresseurs et tolérance : déterminants et prise en charge des principaux effets indésirables. **Encephale**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 553–561, 2016.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986.

DIAS, M. L. **Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutamatérgicos e do óxido nítrico**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2012.

DIAS, M. L. **Efeito antinociceptivo da riparina iv em modelos animais: mecanismos de ação envolvidos**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2017.

DIAZ-CASTRO, B. *et al.* Molecular and functional properties of cortical astrocytes during peripherally induced neuroinflammation. **Cell Reports**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 109508, 2021.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 47–56, 2012.

DWYER, J. B. *et al.* Annual Research Review: Defining and treating pediatric treatment-resistant depression. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 312–332, 2020.

ELDOMIATY, M. A. *et al.* Contribution of glia cells specifically astrocytes in the pathology of depression: Immunohistochemical study in different brain areas. **Folia Morphologica (Poland)**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 419–428, 2020.

ERUSTES, A. G. *et al.* Overexpression of α -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. **Journal of neuroscience research**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 160–171, 2018.

ESCARTIN, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.

FAWZI, S. F. *et al.* Clotrimazole ameliorates chronic mild stress-induced depressive-like behavior in rats; crosstalk between the HPA, NLRP3 inflammasome, and Wnt/ β -catenin pathways. **International immunopharmacology**, [s. l.], v. 127, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38103406/>.

- FERREIRA, N. B. *et al.* Improving dietary patterns in obese mice: Effects on body weight, adiposity, anhedonia-like behavior, pro-BDNF expression and 5-HT system. **Brain Research**, [s. l.], v. 1838, p. 148996, 2024.
- FILHO, J. M. B.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Tyramines of aniba riparia: transformation into models of natural products. **Revista Latinoamericana de Quimica**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 5–7, 1990.
- FITZGERALD, K. A. *et al.* Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 78–83, 6 set. 2001.
- FITZPATRICK, A. *et al.* Three-Dimensional Mapping of Water Surface Waves Using Air-Coupled Sonar. **Oceans Conference Record (IEEE)**, [s. l.], 2023.
- FOSTER, C. G. *et al.* Differences in fatigue-like behavior in the lipopolysaccharide and poly I:C inflammatory animal models. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 232, 2021.
- FUJII, R. K. *et al.* Prevalence, Awareness, Treatment, and Burden of Major Depressive Disorder: Estimates from the National Health and Wellness Survey in Brazil. **Value in Health Regional Issues**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 235–243, 2012.
- GALVAO, T. F. *et al.* Medication use in adults living in Brasilia, Brazil: A cross-sectional, population-based study. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 507–514, 2014.
- GE, C. *et al.* Quercetin attenuates brain apoptosis in mice with chronic unpredictable mild stress-induced depression. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 465, p. 114934, 2024.
- HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1–17, 2012.
- HAWRILENKO, M. *et al.* Individual Differences in the Stability and Change of Childhood Depression: A Growth Mixture Model With Structured Residuals. **Child Development**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. e343–e363, 2021.
- HE, J. H. *et al.* Differential and paradoxical roles of new-generation antidepressants in primary astrocytic inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2021.
- HEOK, K. E.; GAN, G. L. Psychiatric service with no psychiatrist: Developing primary care psychiatry. **Asia-Pacific Psychiatry**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 117–118, 2010.
- HERRMAN, H. *et al.* Time for united action on depression: a Lancet–World Psychiatric Association Commission. **The Lancet**, [s. l.], v. 399, n. 10328, p. 957–1022, 2022.
- HETRICK, S. E. *et al.* New generation antidepressants for depression in children and adolescents: a network meta-analysis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2021, n. 5, 2021.

IMBERTY, A. *et al.* Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

Ji, C. *et al.* Microglial glutaminase 1 deficiency mitigates neuroinflammation associated depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 99, p. 231–245, 2022.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.

KENNARD, B. D. *et al.* Assessment of safety and long-term outcomes of initial treatment with Placebo in TADS. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 166, n. 3, p. 337–344, 2009a.

KENNARD, B. D. *et al.* Remission and recovery in the treatment for adolescents with depression study (TADS): Acute and long-term outcomes. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 186–195, 2009b.

KENNEDY, S. H. Dialogues in Clinical Neuroscience Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. [s. l.], 2008. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tdcn20>.

KIM, H. *et al.* A Quenched Annexin V-Fluorophore for the Real-Time Fluorescence Imaging of Apoptotic Processes In Vitro and In Vivo. **Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, [s. l.], v. 7, n. 24, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33344139/>.

KOKKINIDIS, L. *et al.* Tolerance to d-amphetamine: behavioral specificity. **Life sciences**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 913–917, 1976.

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**, [s. l.], v. 956, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37541369/>.

KORCZAK, D. J.; WESTWELLROPER, C.; SASSI, R. Diagnosis and management of depression in adolescents. **CMAJ. Canadian Medical Association Journal**, [s. l.], v. 195, n. 21, p. E739–E746, 2023.

KRÜGER, C. L. *et al.* Quantitative single-molecule imaging of TLR4 reveals ligand-specific receptor dimerization. **science.org** CL Krüger, MT Zeuner, GS Cottrell, D Widera, M Heilemann **Science signaling**, 2017•science.org, [s. l.], v. 10, n. 503, 2017. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scisignal.aan1308>.

KRUSE, J. L. *et al.* Kynurenine metabolism and inflammation-induced depressed mood: A human experimental study. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 109, p. 104371, 2019.

KUMAR, G. *et al.* Efficient synthesis and molecular docking analysis of quinazoline andazole hybrid derivatives as promising agents for anti-cancer and anti-tuberculosis activities. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1310, p. 138289, 2024.

- LEE, H. G.; WHEELER, M. A.; QUINTANA, F. J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 339–358, 2022.
- LENZE, E. J. *et al.* Incomplete response in late-life depression: Getting to remission. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 419–430, 2008.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.
- LIU, Y. *et al.* Unveiling the hidden pathways: Exploring astrocytes as a key target for depression therapy. **Journal of Psychiatric Research**, [s. l.], v. 174, p. 101–113, 2024.
- LOPES, I. S. *et al.* Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v.120, p. 33-42, 2018.
- LU, L. *et al.* Scutellarin alleviates depression-like behaviors induced by LPS in mice partially through inhibition of astrocyte-mediated neuroinflammation. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 765, p. 136284, 2021a.
- LU, L. *et al.* Scutellarin alleviates depression-like behaviors induced by LPS in mice partially through inhibition of astrocyte-mediated neuroinflammation. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 765, 2021b.
- LU, B.; LIN, L.; SU, X. Global burden of depression or depressive symptoms in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 354, p. 553–562, 2024.
- MAGALHÃES, E. P. *et al.* (–)- α -Bisabolol as a protective agent against epithelial renal cytotoxicity induced by amphotericin B. **Life Sciences**, [s. l.], v. 291, p. 120271, 2022.
- MALLMANN, A. S. V. *et al.* Is Riparin III a promising drug in the treatment for depression?. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 162, p. 105824, 2021.
- MARCH, J. S. Fluoxetine, cognitive-behavioral therapy, and their combination for adolescents with depression: Treatment for Adolescents with Depression Study (TADS) randomized controlled trial. **JAMA**, [s. l.], v. 292, n. 7, p. 807–820, 2004.
- MATSUMOTO, D. *et al.* Bumetanide prevents diazepam-modified anxiety-like behavior in lipopolysaccharide-treated mice. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 904, p. 174195, 2021.
- MCCLUNG, C. A. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. **Pharmacology & therapeutics**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 222–232, 2007.
- MEISSNER, F. *et al.* Direct proteomic quantification of the secretome of activated immune cells. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 475–478, 26 abr. 2013.

- MELEIRO, A. *et al.* Understanding the journey of patients with depression in Brazil: A systematic review. **Clinics**, [s. l.], v. 78, p. 100192, 2023.
- MELO, C. T. V. *et al.* Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n.1, p. 104-112, fev. 2013.
- MELO, C. T. V. DE *et al.* Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.
- MELLO, B. S. F. *et al.* Doxycycline at subantimicrobial dose combined with escitalopram reverses depressive-like behavior and neuroinflammatory hippocampal alterations in the lipopolysaccharide model of depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 292, p. 733–745, 2021.
- MILLER, A. H. Depression and immunity: a role for T cells?. **Brain, behavior, and immunity**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1–8, 2010.
- MORENO, L. C. G. E. A. I. *et al.* Antidepressant-like activity of liposomal formulation containing nimodipine treatment in the tail suspension test, forced swim test and MAOB activity in mice. **Brain Research**, [s. l.], v. 1646, p. 235–240, 2016.
- MORKEN, I. S. *et al.* Depression from preschool to adolescence – five faces of stability. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, [s. l.], v. 62, n. 8, p. 1000–1009, 2021.
- MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MULINARI, S. Monoamine theories of depression: Historical impact on biomedical research. **Journal of the History of the Neurosciences**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 366–392, 2012.
- MURPHY-ROYAL, C.; GORDON, G. R.; BAINS, J. S. Stress-induced structural and functional modifications of astrocytes—Further implicating glia in the central response to stress. **GLIA**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 1806–1820, 2019.
- NASCIMENTO, O. A. *et al.* Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 12, p. 1-14, 2016.
- NADEAU, B. G. *et al.* Thermoregulatory significance of immobility in the forced swim test. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 247, p. 113709, 2022.

OLIVEIRA, I. C. M. **Riparina-I na reversão dos Efeitos Centrais Induzidos por Corticosterona em Camundongos: Possível Envolvimento do Estresse Oxidativo e da Via Nitrérgica.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

OLIVEIRA, I. C. M. **Efeitos centrais da riparina I de aniba riparia (Ness) Mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos.** [s.l.1] Universidade Federal do Ceará. 2012.

OLIVEIRA, N. F. **Efeito antidepressivo e ansiolítico da riparina iv: envolvimento monoaminérgico, gabaérgico e neuroinflamatório.** [s.l.1] Universidade Federal do Ceará. 2019.

OMS. **Depressive disorder (depression).** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>. Acesso em: 31 jul. 2024.

ONAOAPO, Olakunle J. *et al.* Elevated Plus Maze and Y-Maze Behavioral Effects of Subchronic, Oral Low Dose Monosodium Glutamate in Swiss Albino Mice. **Article in IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 21–27, 2012.

PAN, S. M. *et al.* Unraveling the potential of Morinda officinalis oligosaccharides as an adjuvant of escitalopram in depression treatment and exploring the underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 328, p. 118124, 2024.

PATRICK, R. E. *et al.* Treatment resistant late-life depression: A narrative review of psychosocial risk factors, non-pharmacological interventions, and the role of clinical phenotyping. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 356, p. 145–154, 2024.

PEÑA, J. E. *et al.* Investigating Resistance to Antidepressants in Animal Models. **Neuroscience**, [s. l.], v. 548, p. 69–80, 2024.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PHILIPSON, A. *et al.* Adolescent depression and subsequent earnings across early to middle adulthood: a 25-year longitudinal cohort study. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, [s. l.], v. 29, 2020.

PORSOLT, R. D. Animal model of depression. **Biomedicine**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 139–140, 1979.

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. **Expert opinion on investigational drugs**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1107–1130, 2011.

RICO, J. L. R. *et al.* Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 215, n. 1, p. 102–109, 2010.

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**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 959–966, 2012.

RODRIGUES, R. F. *et al.* Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1760–1766, 2012.

SAMPAIO, T. L. *et al.* Nephroprotective effects of (–)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 23, n. 14, p. 1843–1852, 2016.

SARTORI, D. P. *et al.* Involvement of monoaminergic targets in the antidepressant- and anxiolytic-like effects of the synthetic alkaloid riparin IV: Elucidation of further mechanisms through pharmacological, neurochemistry and computational approaches. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 383, p. 112487, 2020.

SATO, S. *et al.* Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- κ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the Toll-Like Receptor Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 4304–4310, 15 out. 2003.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 96, 2015.

SEIXAS, S. R. S. **Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiodepressora.** [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 1996.

SETIAWAN, E. *et al.* Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. **JAMA Psychiatry**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 268–275, 2015.

SHAHZAD, N. *et al.* Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 117, p. 79–84, 2014.

SHI, T. S. *et al.* The antidepressant-like effects of escitalopram in mice require salt-inducible kinase 1 and CREB-regulated transcription co-activator 1 in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 338, p. 228–238, 2023.

SILVA, D. M. A. da *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors alleviated depressive and anxious-like behaviors in mice exposed to lipopolysaccharide: Involvement of oxidative stress and neuroinflammation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 240, p. 173778, 2024.

- SILVA, D. F. O. *et al.* Prevalence of anxiety, depression, and stress among teachers during the COVID-19 pandemic. **Medicine**, [s. l.], v. 100, n. 44, p. e27684, 2021.
- SOHROFOROUZANI, A. M. *et al.* Effect of forced treadmill exercise on stimulation of BDNF expression, depression symptoms, tactile memory and working memory in LPS-treated rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 418, p. 113645, 2022.
- SOUSA, F. C. F. *et al.* Antianxiety effects of riparin I from Aniba riparia (Nees) Mez 94 95 (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 12, p. 1005–1008, 1 dez. 2005.
- SOUSA, F. C. F. *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 95-103, fev. 2014.
- SOUSA, F. C. F. DE *et al.* Antianxiety Effects of Riparin I from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in Mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 1, p. 1005-1008, 2005.
- SOUSA, F. C. F. DE *et al.* Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from Aniba riparia (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1212-1216, 2007.
- SOUSA, F. C. F. *et al.* Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 1, p. 27-33, 2004.
- SOUSA, F. C. F. *et al.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642–654, dez. 2008.
- STEINER, J. *et al.* Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: Evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission?. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 8, 2011.
- STROTHERS, H. S. Depression in the primary care setting. **Ethnicity and Disease**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2002. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcp1712493>.
- SUGHRA, K. *et al.* Interaction of the TNFR-Receptor Associated Factor TRAF1 with I-Kappa B Kinase-2 and TRAF2 Indicates a Regulatory Function for NF-Kappa B Signaling. **PLOS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12683, 2010.
- SUMAYA, I. C.; BAILEY, D.; CATLETT, S. L. Differential effects of a short-term high-fat diet in an animal model of depression in rats treated with the 5-HT₃ receptor antagonist, ondansetron, the 5-HT₃ receptor agonist, 2-methyl-5-HT, and the SSRI, fluoxetine. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 144, p. 78–84, 2016.
- SUN, R. *et al.* C3aR in the medial prefrontal cortex modulates the susceptibility to LPS-induced depressive-like behaviors through glutamatergic neuronal excitability. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 236, p. 102614, 2024.

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

TAILOR, P.; TAMURA, T.; OZATO, K. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. **Cell Research** 2006 16:2, v. 16, n. 2, p. 134–140, 13 fev. 2006.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 350, n. 1, p. 21–29, 1998.

TANG, M. *et al.* Hippocampal neurogenesis dysfunction linked to depressive-like behaviors in a neuroinflammation induced model of depression. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 161, p. 166–173, 2016.

TEIXEIRA, C. P. L. *et al.* Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 129-137, abr. 2013.

THAI, M. *et al.* Deep transcranial magnetic stimulation for adolescents with treatment-resistant depression: A preliminary dose-finding study exploring safety and clinical effectiveness. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 354, p. 589–600, 2024.

THUM, C. *et al.* Dietary supplementation of SAT and SANT, New Zealand deer velvet supplements, halts systemic LPS-induced neuroinflammation and sickness behaviour in mice. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 116, p. 106225, 2024.

TOMAZ, V. de S. *et al.* Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro- and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 268, p. 188–200, 2020.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TROUBAT, R. *et al.* Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 151–171, 2021.

UNFPA BRASIL | RELATÓRIO SITUAÇÃO DA POPULAÇÃO MUNDIAL 2022. [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: <https://brazil.unfpa.org/pt-br/publications/situacao-da-populacao-mundial-2022>.

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

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. **View of Depression, antidepressants and immune system: a new look to an old problem**. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/acp/article/view/17163/19170>.

- VOS, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10053, p. 1545–1602, 2016.
- WANG, Q. *et al.* An astroglial basis of major depressive disorder? An overview. **GLIA**, [s. l.], v. 65, n. 8, p. 1227–1250, 2017.
- WANG, J. *et al.* Microglial activation contributes to depressive-like behavior in dopamine D3 receptor knockout mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 83, p. 226–238, 2020.
- WOHLEB, E. S. *et al.* Stress-Induced Neuronal Colony Stimulating Factor 1 Provokes Microglia-Mediated Neuronal Remodeling and Depressive-like Behavior. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 38–49, 2018.
- WRIGHT, I. *et al.* Dropout from randomised controlled trials of psychological treatments for depression in children and youth: a systematic review and meta-analyses. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 281, p. 880–890, 2021.
- WU, X. *et al.* Electroacupuncture attenuates LPS-induced depression-like behavior through kynurenine pathway. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 16, p. 1052032, 2022.
- WU, Y. *et al.* Malva sylvestris extract alleviates the astrogliosis and inflammatory stress in LPS-induced depression mice. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 336, 2019.
- XIA, C. Y. *et al.* The NLRP3 inflammasome in depression: Potential mechanisms and therapies. **Pharmacological Research**, v. 187, p. 106625, 1 jan. 2023.
- XIAO, S. *et al.* Mechanisms of food-derived bioactive compounds inhibiting TLR4 activation and regulating TLR4-mediated inflammation: A comprehensive review and future directions. **Food Bioscience**, [s. l.], p. 104587, 2024.
- XIE, L. *et al.* The Anti-Depressive Effects of Hesperidin and the Relative Mechanisms Based on the NLRP3 Inflammatory Signaling Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 11, 2020.
- 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**, [s. l.], v. 12, n. 10, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37408252/>.
- YAMADA, K. *et al.* Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **Neuroscience**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 365–374, 1996.
- YONG, V. W. Inflammation in neurological disorders: A help or a hindrance?. **Neuroscientist**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 408–420, 2010.
- YUAN, N. *et al.* An Integrated Pharmacology-Based Analysis for Antidepressant Mechanism of Chinese Herbal Formula Xiao-Yao-San. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 11, 2020.

YUE, Q. *et al.* Canthin-6-one (CO) from *Picrasma quassioides* (D.Don) Benn. ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced astrocyte activation and associated brain endothelial disruption. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 101, p. 154108, 2022.

ZARZA-REBOLLO, J. A. *et al.* The relationship between BDNF and physical activity on depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 134, p. 111033, 2024.

ZENG, X. *et al.* Phoenixin-20 Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Activation of Microglial NLRP3 Inflammasome. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 785–792, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: Current research and prospective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 235, p. 114291, 2022a.

ZHANG, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: Current research and prospective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 235, 2022b.

ZHAO, X. *et al.* Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. **Behavioural brain research**, [s. l.], v. 364, p. 494–502, 2019.

ZHAO, J. *et al.* Low-dose ketamine inhibits neuronal apoptosis and neuroinflammation in PC12 cells via $\alpha 7$ nAChR mediated TLR4/MAPK/NF- κ B signaling pathway. **International immunopharmacology**, [s. l.], v. 117, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36842233/>.

ZHAO, D. *et al.* Midbrain FA initiates neuroinflammation and depression onset in both acute and chronic LPS-induced depressive model mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 117, p. 356–375, 2024.

ZHENG, Y. *et al.* Advances in molecular agents targeting toll-like receptor 4 signaling pathways for potential treatment of sepsis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 268, p. 116300, 2024.

ZHENG, L. *et al.* Longitudinal association between triglyceride glucose index and depression progression in middle-aged and elder adults: A national retrospective cohort study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 507–515, 2023.

ZHOU, Z. *et al.* CircDYM attenuates microglial apoptosis via CEBPB/ZC3H4 axis in LPS-induced mouse model of depression. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 254, p. 127922, 2024.

ZHOU, S. *et al.* Low-dose Esketamine suppresses NLRP3-mediated apoptotic and pyroptotic cell death in microglial cells to ameliorate LPS-induced depression via ablating GSK-3 β . **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 459, p. 114782, 2024.

Anexo 1 – 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 "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS in vitro E in vivo DA RIPARINA IV EM CAMUNDONGOS C57BL/6 SUBMETIDOS AO MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) de Escherichia Coli", protocolada sob o CEUA nº 6321230822 (ID 002377), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa e equipe; Victor Celso Cavalcanti Capibaribe** - 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 30/03/2023.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF RIPARIN IV IN MICE (C57BL/6) SUBMITTED TO THE MODEL OF NEUROINFLAMATION INDUCED BY LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) from Escherichia Coli", utilizing 250 isogenics mice (250 males), protocol number CEUA 6321230822 (ID 002377), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa and team; Victor Celso Cavalcanti Capibaribe** - 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 03/30/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2023 a 08/2024 Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 42 a 48 dias

Quantidade: 250

Linhagem: C57BL/6

Peso: 18 a 29 g

Fortaleza, 31 de julho de 2024

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

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

