



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

SHEILA MARA AIRES BANDEIRA

**EFEITOS DO BARICITINIBE SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
LIPOLISSACARÍDEO: ESTUDO IN VITRO EM CÉLULAS PC 12 E ASTRÓCITOS
E IN VIVO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS.**

Fortaleza- CE

2025

SHEILA MARA AIRES BANDEIRA

EFEITOS DO BARICITINIBE SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO: ESTUDO IN VITRO EM CÉLULAS PC 12 E ASTRÓCITOS E
IN VIVO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS.

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

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

FORTALEZA- CE

2025

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)

B164e Bandeira, Sheila Mara Aires.

Efeitos do baricitinibe sobre a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo: estudo in vitro em células PC12 e astrócitos e in vivo em camundongos C57BL/6 fêmeas. / Sheila Mara Aires Bandeira. – 2025.

96 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

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

1. Neuroinflamação. 2. Transtornos mentais. 3. Inibidor de JAK. I. Título.

CDD 615.1

SHEILA MARA AIRES BANDEIRA

EFEITOS DO BARICITINIBE SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO: ESTUDO IN VITRO EM CÉLULAS PC 12 E ASTROCITOS E
IN VIVO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 13/06/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

Dra. Manoela de Oliveira Rebouças

À Deus.

Aos meus pais, irmã, noivo e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, meu melhor amigo, que me conhece de todas as maneiras, principalmente quando estou no nível do desespero. Obrigada, meu bom Deus, por sempre cuidar de mim e colocar pessoas que me ajudaram nessa trajetória. Obrigada à Nossa Senhora Maria Santíssima, que, por sua fiel intercessão, sempre conseguiu me colocar no eixo. A todos os meus amigos do céu, Santa Teresinha, São José, São Gabriel, obrigada.

Aos meus queridos pais, sem eles eu nada seria. Obrigada pelo dom da vida, por acreditarem em mim e por me darem todo o suporte que preciso. Vocês são sensacionais!

À minha querida e amada irmã, que sempre escuta minhas labutas, obrigada por tanto! Você é uma preciosidade em minha vida. Te agradeço por todo apoio e por acreditar tanto em mim. Ao meu noivo Ítalo, que em meio às minhas tempestades, você me traz calmaria, você confia tanto em mim e sempre me apoia em todas as minhas loucuras. Obrigada por se aventurar comigo nesta vida.

À minha tia Vilani e à minha prima Thais, que me acolheram durante o processo de escrita, enquanto minha casa estava em construção. Vocês me deram todo o suporte e me fizeram sentir em casa mesmo não estando. Obrigada por isso!

Às minhas amigas de caminhada e de vida — Leidiane, Bete, Cris, Carol, Myla, Karina— obrigada pelo apoio e incentivo, pelos momentos de convivência. Sem dúvida, esses momentos são memoráveis! Ao PDA que é meu combustível espiritual!

Ao meu cunhado Iandre, pelas partilhas e vivências que me ajudaram a descontrair.

Aos meus afilhados eles trazem fofura e o desejo de ser uma pessoa melhor a cada dia: Tetê, Tutu e Ana Liz, madrinha ama vocês! À minha afilhada de crisma, Esterfany, obrigada pelos cafés da tarde, pelas conversas. Você é muito especial! À Lulu, que é meu xodó, obrigada pelos momentos de desestresse com seus carinhos e cuidado!

Aos meus amigos do LabNeuro, especialmente à Manoela, que foi a primeira pessoa que conheci. Ela fez minha entrevista para ser aluna de iniciação científica. Jamais imaginei que aquela pessoa, para cuja reunião online eu tanto me preparei, se tornaria minha amiga e uma inspiração para mim. Obrigada! À Larice, minha amiga de fé e de RU, obrigada, amiga, por toda ajuda, conselhos e incentivo. Obrigada por tanto!

À Iardja, que conheci no início do meu mestrado e que foi minha primeira dupla de

experimentos. Como sou grata a você por todos os ensinamentos, pela paciência e por toda parceria! Eu precisava conhecer alguém como você, que me colocaria um freio.

Ao Dila, minha segunda dupla de mestrado, esse sim é calmo, mas um pouco mais desesperado . Sou muito grata pela sua parceria! Aprendi muito com você e ri bastante. Você topava minhas loucuras de fazer experimentos até tarde, de ter várias invenções. Sou muito grata por este tempo e tenho certeza de que você será muito reconhecido, porque é brilhante!

Ao meu amigo Daniel, que foi o primeiro incentivador para que eu trabalhasse com o baricitinibe. Obrigada pelo apoio, pelos dias compartilhados de experimentos e por confiar em mim! A todos os alunos da professora Cléa, Guilherme, Lorena, Sabrina, Pedro, enfim, todos obrigada por toda ajuda e incentivo. Estamos juntos! Também agradeço aos alunos de iniciação científica Paolla, Amanda, Guilherme, Ketsya, Letícia, Geyssiane, Guendalina, Carina, Juliana, Herculano, Zoeh — obrigada pela ajuda nos dias de experimentos ou por se colocarem à disposição para ajudar.

Ao professor Tiago, que me acolheu tão bem no laboratório e na cultura, sempre disposto a ajudar. Obrigada de verdade, você é sensacional!

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC): À Bel, obrigada por toda paciência ao ensinar o manuseio com as células. Você é uma excelente professora. Ao Emanuel, obrigada por toda ajuda nos experimentos in vitro. Você foi fundamental. À Erlânia, por sanar minhas dúvidas e compartilhar protocolos. Obrigada! Aos professores: Ramon, que me ajudou nos cálculos e na compreensão dos experimentos e Said, que me auxiliou no processo de diluição para os experimentos in vivo.

Aos profissionais do biotério: Eduardo Torres, Gaby maravilhosa e sempre disposta a ajudar!. Wesley e Augusto obrigada pela parceria e por toda ajuda!

À minha orientadora Cléa, obrigada, primeiramente, por me aceitar como sua aluna desde a iniciação científica. Mesmo sendo aluna de outra instituição, sempre fui tratada por igual. Obrigada pelos incentivos, por confiar tanto em mim (mesmo quando eu duvidava), pelos ensinamentos, orientações e correções. Você é incrível, saiba sempre disso!

E, por fim, mas não menos importantes, agradeço aos camundongos, pois, sem eles, este trabalho não seria realizado.

À Universidade Federal do Ceará, ao PPGF, NPDM e à CAPES, obrigada por todo suporte!

“O bom Deus não poderia nos inspirar sonhos
irrealizáveis” (Santa Terezinha do Menino Jesus)

RESUMO

Os transtornos mentais são síndromes caracterizadas por uma perturbação clinicamente significativa na cognição, na regulação emocional ou no comportamento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 280 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por esses transtornos, sendo a depressão uma das condições mais prevalentes. Nesse cenário, cresce o interesse em compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, como a hipótese da neuroinflamação, que sugere que processos inflamatórios podem desestabilizar o microambiente do sistema nervoso central (SNC), contribuindo para déficits cognitivos, transtornos de ansiedade e depressão. Dentre os alvos terapêuticos em investigação, destaca-se o baricitinibe (BARI), um inibidor seletivo da enzima Janus quinase (JAK), envolvida na transdução de sinais intracelulares e na regulação de processos celulares fundamentais, incluindo a resposta inflamatória. Dado o mecanismo de ação do BARI, esse estudo buscou investigar em modelos *in vitro*, utilizando células PC12 e astrócitos, e *in vivo*, empregando camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 ação do BARI, em um modelo neuroinflamação induzida por lipopolissacárido (LPS). Nos experimentos *in vitro*, foram analisados ensaio de redução de MTT, morte celular, função mitocondrial, mensuração de espécies reativas de oxigênio (ERO), e dosagem de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Já nos experimentos *in vivo*, os camundongos foram submetidos ao LPS nas doses de 0,5 mg/kg ou 1 mg/kg por 5 ou 10 dias, seguidos do tratamento com BARI, fluoxetina ou escitalopram 10mg/kg. Após os tratamentos, os animais foram avaliados por meio de testes comportamentais (campo aberto, placa pefurada, nado forçado), análise do ciclo estral por lavado vaginal e quantificação de citocinas no hipocampo. Os resultados *in vitro* demonstraram que o baricitinibe reduziu apoptose, necrose, disfunção mitocondrial e de produção de ERO, além de apresentar redução nas citocinas. No entanto, nos testes *in vivo*, o fármaco não reverteu de forma significativa os comportamentos tipo ansiosos, depressivos e dano cognitivo induzidos pelo LPS e também não alterou os níveis de IL-6 e TNF- α no hipocampo, isso pode ser explicado devido ao ciclo estral que os camundongos estavam como estro, devido a interação com SNC. Neste estudo, embora tenha-se evidenciado efeito citoprotetor *in vitro*, o BARI não conseguiu alcançar efeitos significativos nos comportamentos. Além disso, destaca-se a influência das oscilações hormonais na regulação do SNC e sua possível relação com as manifestações nos comportamentos mensurados neste estudo.

Palavras-chave: neuroinflamação, transtornos mentais, inibidor de JAK

ABSTRACT

EFFECTS OF BARICITINIB ON LIPOPOLYSACCHARIDE INDUCED NEUROINFLAMMATION: IN VITRO STUDY IN PC12 CELLS AND ASTROCYTES AND IN VIVO IN FEMALE C57BL/6 MICE.

Mental disorders are syndromes characterized by clinically significant disturbances in cognition, emotional regulation, or behavior. According to the World Health Organization (WHO), approximately 280 million people worldwide are affected by these disorders, with depression being one of the most prevalent conditions. In this context, there is growing interest in understanding the pathophysiological mechanisms involved, such as the neuroinflammation hypothesis, which suggests that inflammatory processes may destabilize the central nervous system (CNS) microenvironment, contributing to cognitive deficits, anxiety disorders, and depression. Among the therapeutic targets under investigation, baricitinib (BARI) stands out—a selective inhibitor of the Janus kinase (JAK) enzyme, which is involved in intracellular signal transduction and the regulation of key cellular processes, including inflammatory responses. Given BARI's mechanism of action, this study aimed to investigate its effects using in vitro models with PC12 cells and astrocytes, and in vivo models with female C57BL/6 mice subjected to neuroinflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). In the in vitro experiments, analyses included MTT reduction assay, cell death, mitochondrial function, measurement of reactive oxygen species (ROS), and quantification of the cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α . In the in vivo experiments, mice received LPS at doses of 0.5 mg/kg or 1 mg/kg for 5 or 10 days, followed by treatment with BARI, fluoxetine, or escitalopram at 10 mg/kg. After the treatments, the animals were evaluated using behavioral tests (open field, hole-board, novel object recognition, forced swim), estrous cycle analysis via vaginal lavage, and cytokine quantification in the hippocampus. The in vitro results demonstrated that baricitinib reduced apoptosis, necrosis, mitochondrial dysfunction, and ROS production, in addition to lowering cytokine levels. However, in the in vivo tests, the drug did not significantly reverse LPS-induced anxiety-like, depressive-like behaviors or cognitive impairment, nor did it alter IL-6 and TNF- α levels in the hippocampus. This may be explained by the estrous cycle stages in which the animals were, such as estrus, metestrus, and diestrus. This study demonstrates that baricitinib exerts significant effects in modulating neuroinflammation in in vitro assays, highlighting its cytoprotective potential. Additionally, it emphasizes the influence of hormonal fluctuations on CNS regulation and their possible association with the behavioral outcomes observed in this study.

Keywords: neuroinflammation, mental disorders, JAK inhibito

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Interação do sistêmica periférico com o SNC e a produção de citocinas.....	25
Figura 2 – Representação do mecanismo de ação do BARI e sua interação com as citocinas.	27
Figura 3 – Delineamento Experimental dos experimentos <i>in vitro</i>	33
Figura 4 – Fluxograma das etapas do teste de viabilidade para avaliação da citotoxicidade do BARI.....	35
Figura 5 – Demonstração do funcionamento do teste de marcação e avaliação de apoptose e necrose.....	36
Figura 6- Representação do teste de análise do potencial transmembranar mitocondrial com o corante RhO 23.....	37
Figura 7 – Demonstração de como funciona o teste para análise de espécie reativa de oxigênio através da conversão de DCFH-DA em DCFH e DCF-oxi.....	35
Figura 8 – Delineamento experimento do protocolo 1 de exposição ao LPS 0,5mg/kg durante 5 dias.....	40
Figura 9 – Delineamento experimento do protocolo 2 de exposição ao LPS 0,5mg/kg ou LPS 1mg/kg durante 5 dias.....	41
Figura 10 – Delineamento experimento do protocolo 3 de exposição ao LPS 0,5mg/kg durante dez dias.....	42
Figura 11 – Teste campo aberto.....	43
Figura 12 – Teste nado forçado.....	44
Figura 13 – Teste placa perfurada.....	45
Figura 14 – Teste reconhecimento de objetos	46
Figura 15 – Demonstração do protocolo lavado vaginal.....	51
Figura 16 – Teste de viabilidade celular de redução de MTT analisando atividade do baricitinibe nas células PC12 e .astrócitos.	55
Figura 17 – Análise da atividade do baricitinibe na morte celular, após a exposição do LPS.....	57
Figura 18 – Gráficos de densidade mostram a avaliação comparativa da via de morte celular. Células necróticas foram marcadas com 7AAD, e apoptóticas com anexina V, em células PC12 e astrócitos.....	59
Figura 19 – Imagens microscópicas das células astrócitos e PC12.....	61
Figura 20 – Avaliação da integridade mitocondrial, através da fluorescência.....	62

Figura 21 – Histograma representativo do ensaio de Rodamina123 demonstrando o potencial transmembrânico mitocondrial em células astrócitos (A) e PC12 (B)	63
Figura 22 – Análise da atividade antioxidante do baricitinibe através da marcação de DCF.....	64
Figura 23 – Histograma representativo do ensaio de DCFH-DA demonstrando a produção de espécies reativas de oxigênio em células astrócitos (A) e PC12 (B)	65
Figura 24 – Avaliação da atividade antiinflamatória do baricitinibe por meio da quantificação de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1) no sobrenadante de culturas de astrócitos e células PC1...	67
Figura 25 – Efeito do baricitinibe na atividade locomotora e exploratória foi avaliado pela distância percorrida no teste campo aberto, em protocolos de 5 e 10 dias.....	69
Figura 26 – Efeito do baricitinibe na atividade ansiolítica, pelo tempo na zona central do campo aberto, em protocolos de 5 e 10 dias.....	70
Figura 27 – Efeito do tratamento do baricitinibe 10mg/kg no teste placa perfurada, avaliação do comportamento ansioso no protocolo de 5 e 10 dias.....	73
Figura 28 – Efeito do tratamento do baricitinibe 10mg/kg no teste nado forçado no protocolo de 5 dias de LPS.....	75
Figura 29 – Efeito do baricitinibe na memória curto prazo mensurado no teste reconhecimento de objetivos	76
Figura 30 – Esfregaço vaginal representando as diferentes fases do ciclo estral dos camundongos...	77
Figura 31 – Análise da atividade antiinflamatória do baricitinibe por meio da quantificação de citocinas (TNF- α , IL-6) no hipocampo em animais submetidos a exposição de LPS.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos resultados do protocolo 1 obtidos após o tratamento com baricitinibe e fluoxetina em animais submetidos à exposição ao LPS.....	90
Tabela 2 – Resumo dos resultados do protocolo 2 obtidos após o tratamento com baricitinibe e fluoxetina em animais submetidos à exposição ao LPS.....	91
Tabela 3 – Resumo dos resultados do protocolo 3 obtidos após o tratamento com baricitinibe e fluoxetina em animais submetidos à exposição ao LPS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-HT 5-Hidroxitriptamina ou Serotonina
ANX	Anexina
ATP	Adenosina trifosfato
BARI	Baricitinibe
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira Hematoencefálica
CT	Controle
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCFH-DA	2',7' diacetato de diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco modified eagles minimal essential médium
DMS-5	Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DMSO	Dimetilfulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay.
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ER α	Estrogênio alfa
ER β	Estrogênio beta
ESC	Escitalopram
FDA	Food and Drug Administration
FLU	Fluotexina
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
JAKs	Enzimas Janus Quinases
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio,
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OI	Objeto Igual
ON	Objeto novo
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Phosphate Buffer Solution.

PIB	Produto Interno Bruto
RE	Receptores de estrogênio
RHO123	Rodamina 123
SERT	Transportadores de serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
STATs	Transdutor de Sinal e Ativadores de Transcrição
TEA	Transtorno do espectro autista
TLR4	Receptor do tipo toll-like 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Transtornos mentais	17
1.2 Fisiopatologia dos transtornos mentais	19
1.3 Interações hormonais com o SNC	20
1.4 Neuroinflamação	22
1.5 Lipopolissacarídeo	24
1.6 Baricitinibe	25
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Substâncias utilizadas	30
4.1.1 Baricitinibe	30
4.1.2 Lipopolissacarídeo	30
4.1.3 Antidepressivos de referência	31
4.2 Testes <i>in vitro</i>	31
4.2.1 Manutenção e cultivo celular	31
4.2.2 Delineamento experimental	32
4.2.3 Teste de viabilidade celular	34
4.2.4 Integridade de membrana e fosfatidilserina.....	35
4.2.5 Potencial transmembrânico mitocondrial	37
4.2.6 Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	38
4.2.7 Níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante	39
4.3 Testes <i>in vivo</i>	40
4.3.1 Animais	40
4.3.2 Delineamento experimental	40
4.4 Testes comportamentais	46
4.4.1 Campo aberto	46
4.4.2 Nado forçado	47
4.4.3 Placa perfurada	48
4.4.4 Reconhecimento do objeto novo	49
4.4.5 Determinação do ciclo estral	50
4.5 Testes neuroquímicos	52
4.5.1 Dosagem de citocinas	53
4.6 Análise estatística	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Testes <i>in vitro</i>	54
5.1.1 Viabilidade celular.....	56
5.1.2 Mecanismo de morte celular	57
5.1.3 Potencial mitocondrial	62
5.1.4 Produção de espécies reativas de oxigênio	64
5.1.5 Citocinas pró-inflamatórias	66
5.2 Testes <i>in vivo</i>	68
5.2.1 Campo aberto	68
5.2.2 Placa perfurada	72

5.2.3 Nado forçado	74
5.2.4 Reconhecimento do objeto novo	76
5.2.5 Ciclo estral	77
5.2.6 Testes neuroquímicos	78
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	89
7.1 Resumo dos resultados <i>in vivo</i>	90
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE	94
ANEXO A – Certificado de Aprovação da CEUA	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos Mentais

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DMS-5), transtorno mental é uma síndrome caracterizada por uma perturbação clinicamente significativa na cognição, regulação emocional ou comportamento de um indivíduo que reflete uma disfunção nos processos psicológicos e biológicos. E estão geralmente associados a sofrimento significativo, comprometimento nas áreas sociais, ocupacionais ou em outras áreas importantes de funcionamento. Dentro do DMS-5, há inúmeros transtornos neuropsiquiátricos presentes, como transtornos de neurodesenvolvimento a saber transtorno do espectro autista (TEA), Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade, transtorno depressivo, transtorno de ansiedade, esquizofrenia, transtorno neurocognitivo dentre outros (Amoretti; Lalumera, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021), estima-se que 280 milhões de pessoas incluindo 5% de todos os adultos, sofre de depressão. A OMS também destaca que uma em cada quatro famílias tem, pelo menos, um membro diagnosticado com algum transtorno psiquiátrico, sendo que, na maioria das vezes, os familiares assumem o papel de cuidadores primários. Esse cenário gera um impacto significativo tanto na qualidade de vida das pessoas afetadas quanto nas condições econômicas dos lares.

Acerca disso, segundo a OMS (2023) ressaltou que 1 em cada 6 pessoas sofre de depressão em algum momento da vida. No ano de 2021, dados do Ministério da Saúde sobre a distribuição sociodemográfica mostraram que a incidência de diagnósticos no Brasil foi registrada em 11,3%, sendo este transtorno mais prevalente entre indivíduos do sexo feminino, 14,7%, se comparado com indivíduos do sexo masculino, 7,3%, ressaltando que mulheres são mais suscetíveis aos transtornos psiquiátricos.

As doenças mentais representam a principal causa de carga global de doenças, superando outras condições crônicas, como doenças cardiovasculares, respiratórias, digestivas, musculoesqueléticas e neoplasias. Estima-se que as doenças neuropsiquiátricas sejam responsáveis por cerca de um terço da carga de incapacidade atribuída a todas as doenças, com a depressão figurando como a condição com maior impacto mundial (Rocha,Hara,Paprocki,2015).

Em virtude disso, as doenças mentais têm repercussões econômicas substanciais. Conforme o Fórum Econômico Mundial e a Escola de Saúde Pública de Harvard (2011), as perdas econômicas globais associadas a doenças mentais, cardiovasculares, respiratórias

crônicas, câncer e diabetes mellitus foram estimadas em US\$ 47 trilhões, valor equivalente a aproximadamente 75% do Produto Interno Bruto (PIB) global em 2010. Dentre essas condições, as doenças mentais foram responsáveis pela maior parte dessa perda econômica.

Em termos financeiros, o custo global das doenças mentais foi estimado em US\$ 2,5 trilhões em 2010 e deverá atingir US\$ 6 trilhões até 2030. Esses valores são particularmente alarmantes quando comparados ao gasto total com saúde no mundo em 2009, que foi de US\$ 5,1 trilhões, ou ao PIB dos países de baixa renda, que não alcança US\$ 1 trilhão. Sob qualquer perspectiva de análise, é evidente a magnitude do impacto das doenças mentais, tanto em termos de sofrimento individual e familiar quanto em relação ao fardo econômico global. Elas são uma das principais responsáveis pela perda de qualidade de vida, incapacitação e mortes precoces, além de representarem uma parcela significativa dos custos com saúde em nível mundial (Rocha; Hara; Paprocki, 2015).

A pandemia destacou ainda mais a importância da saúde mental, especialmente devido aos efeitos do SARS-CoV-2. Embora seja amplamente reconhecido como um vírus predominantemente respiratório, ele também possui a capacidade de afetar o Sistema Nervoso Central (SNC). Essas complicações podem ter consequências de longo prazo, como o aumento do risco de desenvolvimento de distúrbios neurológicos e neurodegenerativos. Paralelamente, a pandemia intensificou os impactos psicossociais, agravando problemas de saúde mental em diversas populações. Os efeitos foram amplificados pelo isolamento social, mudanças abruptas no estilo de vida e o medo constante de contaminação, criando um ambiente propício ao surgimento ou agravamento de transtornos como ansiedade, depressão, insônia e sintomas relacionados ao transtorno de estresse pós-traumático (Sinanovic; Muftic; Sinanovic, 2020).

Esse contexto é reforçado, pois o Brasil, por exemplo, registrou um aumento expressivo na venda de antidepressivos desde o início da crise sanitária. Em 2022, foram comercializadas 112.797.268 unidades de antidepressivos, o que representa um aumento de 36% em relação a dado de 2019, segundo o Conselho Federal de Farmácia (2023), consolidando essa classe de medicamentos entre os mais consumidos no país (Magno et al., 2023).

1.2 Fisiopatologia dos Transtornos Mentais

Analizando o contexto e o quadro dos transtornos mentais, pode-se observar uma prevalência de dois transtornos como a depressão e a ansiedade. A OMS (2021), declarou que a depressão é uma doença que está presente em aproximadamente 280 milhões de pessoas. É caracterizada por mudanças no humor, perda de prazer pela vida, falta de perspectiva com o futuro e muitos outros sintomas que incapacitam por afetar o meio social, familiar e a

autoestima do paciente. Apesar de existir tratamento eficaz para esse transtorno mental, há resistência quanto à aderência, devido a alguns fatores como falta de recursos, de suporte profissional, efeitos adversos, tempo de latência e o estigma social relacionado às doenças mentais.

Em decorrência do desenvolvimento gradativo dos sintomas da depressão, há uma maior dificuldade no reconhecimento da doença por parte do paciente, fazendo com que a busca por ajuda ocorra quando os sintomas já estão avançados. O paciente sente perda de interesse por inúmeras atividades, humor deprimido, alterações no sono e apetite, sentimento de culpa e inutilidade, dificuldade para tomada de decisões pela dificuldade de concentração, e, em muitos casos, o pensamento recorrente sobre o suicídio. Para estabelecimento do diagnóstico, é necessário que alguns desses sintomas estejam presentes de forma crônica e persistente por, no mínimo, duas semanas (Perez-Caballero et al., 2019).

Somado, ressalta-se que essa doença ainda é bastante negligenciada, o que causa uma relutância em procurar ajuda psiquiátrica, ou até mesmo a resistência ao tratamento. Ademais, a demora para o diagnóstico pode acarretar o agravamento dos sintomas e impactos negativos em outras doenças (Bartkiene et al., 2018).

A depressão também está relacionada com outros transtornos psíquicos, um vez que tem sido mostrado que cerca de 85% dos pacientes depressivos apresentam ansiedade e cerca de 90% daqueles com transtornos de ansiedade apresenta depressão. Os transtornos de ansiedade são quase sempre a condição primária, com início geralmente ocorrendo na infância ou adolescência. Há estudos que evidenciam que essas comorbidades podem ser explicadas por um aumento do fator de liberação de corticotropina no líquido cefalorraquidiano e, mais recentemente, tem sido visto que as vias oxidativa, nitrosativa e neuroinflamatórias estão relacionadas. Ademais, é mais provável que o primeiro episódio de depressão surja em decorrência de um fator estressor (Tiller, 2013).

Nesse contexto, é fundamental destacar que, por se tratar de uma doença multifatorial, diversas hipóteses têm sido propostas para explicar suas causas, porém hoje os medicamentos para essas patologias são baseados, apenas dentro da teoria de monoaminas, que descreve que a depressão é causada por um desequilíbrio químico no cérebro, envolvendo neurotransmissores como serotonina, dopamina e noradrenalina, que pertencem à classe das monoaminas (Krishnan; Nestler, 2008). A teoria baseia-se no fato de que fármacos que elevam a disponibilidade de monoaminas, como os antidepressivos tricíclicos, os antidepressivos tetracíclicos, os inibidores da monoamina oxidase e os inibidores seletivos da recaptação da serotonina, têm efeito antidepressivo (Haase; Brown, 2015; Korf; Van Praag, 1971).

Os antidepressivos de primeira escolha são os inibidores seletivos da recaptação da serotonina, como fluoxetina, escitalopram, Jonal da USP publicado em (2019). Embora, cerca de 2/3 dos pacientes deprimidos não respondam adequadamente ao tratamento inicial com esses antidepressivos e aproximadamente 30% não respondem a múltiplas intervenções farmacológicas, isso evidencia que a causa subjacente da depressão vai muito além do mecanismo das monoaminas (Li et al., 2020).

Além de sua complexa patogênese, a depressão frequentemente coexiste com a ansiedade, levando ao surgimento de uma ampla gama de sintomas, tanto físicos quanto mentais, que acompanham esses transtornos (Lader, 1983). A depressão também pode afetar a função cognitiva, sendo notoriamente ligada a dificuldades na memória de curto prazo (Marazziti et al., 2010). Ademais, a depressão pode alterar a estrutura e função do cérebro, especialmente em áreas responsáveis pela regulação do humor e memória, o que contribui para a persistência desses problemas (Knapman et al., 2010).

1.3 Interações hormonais com SNC

Dentro dessa interação há diversos questionamentos, principalmente considerando que os transtornos psiquiátricos são mais prevalentes no sexo feminino. Essa diferença pode ser atribuída às flutuações hormonais que as mulheres experimentam ao longo da vida, em diferentes fases de desenvolvimento, como o ciclo menstrual, gravidez, pós-parto, lactação e menopausa. Essas variações hormonais podem influenciar a função cerebral e a saúde mental. Evidências até o momento sugerem que transtornos como ansiedade e distúrbios de humor são particularmente suscetíveis às flutuações hormonais características dessas fases, entretanto, há indícios de um efeito protetor dos hormônios reprodutivos femininos em relação à esquizofrenia (Altemus, 2019).

Os estrogênios são os principais hormônios sexuais femininos, originalmente caracterizado por seu papel importante na maturação sexual e reprodução. Estudos recentes têm demonstrado que os estrogênios desempenham papéis críticos em funções cerebrais, como cognição, aprendizado, memória, neurodesenvolvimento e neuroplasticidade (Hamson; Roes; Galea, 2016). É produzido centralmente pelo cérebro e perifericamente pelos ovários e outros tecidos. No cérebro, o estrogênio é produzido em muitas regiões, incluindo o hipocampo, córtex, cerebelo, hipotálamo e amígdala. Os neurônios são o principal local de síntese de estrogênio no cérebro, mas também podem ser produzidos por astrócitos, mas não por microglia ou oligodendrócitos. O estradiol é a forma bioativa do estrogênio, mas outras formas de estrogênio

são produzidas pelas mulheres estrona e estriol (Nelson; Bulun, 2001)

Dessa forma, exerce diversos efeitos neuroprotetores no cérebro, sendo amplamente reconhecido por sua capacidade de modular a saúde neuronal e as respostas a fatores de estresse e inflamação. Esse hormônio atua principalmente através de dois receptores, o receptor de estrogênio alfa (ER α) e o receptor de estrogênio beta (ER β), que estão presentes em várias áreas do sistema nervoso central, incluindo o hipocampo e o córtex pré-frontal (Crider; Pillai, 2017).

Acerca disso, promove a síntese de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), uma proteína crucial para a sobrevivência, crescimento e diferenciação de neurônios. O BDNF também está envolvido na plasticidade sináptica, que é a capacidade do cérebro de modificar as conexões entre os neurônios em resposta a experiências e estímulos, e no processo de aprendizagem e memória. Estudos indicam que o estrogênio regula positivamente a expressão do BDNF, o que sugere que ele pode contribuir para a manutenção da saúde neuronal e a adaptação a mudanças ambientais ou fisiológicas (Sulzbach, 2011)

Além dos efeitos relacionados às neurotrofinas, o estrogênio também tem um papel importante na modulação da resposta inflamatória no cérebro. A ativação dos receptores de estrogênio (RE) induzida pelo estrogênio resulta na redução da atividade de fatores de transcrição, como o NF- κ B (Fator nuclear kappa B), que está fortemente envolvido na regulação da inflamação e no controle da resposta a fatores de estresse. A ativação do NF- κ B aumenta a expressão de genes pró-inflamatórios, e sua inibição pelo estrogênio ajuda a reduzir a inflamação no cérebro, promovendo um ambiente mais favorável à sobrevivência neuronal (Harding; Heaton, 2022).

O estrogênio também exerce um efeito protetor contra o estresse do retículo endoplasmático, um processo que ocorre quando a célula enfrenta condições adversas, como disfunções no dobramento de proteínas ou disfunções metabólicas. O estresse no retículo endoplasmático pode induzir a morte celular e a inflamação. O estrogênio ajuda a aliviar esse estresse e pode promover respostas celulares de sobrevivência e adaptação. Além disso, o estrogênio influencia a diferenciação neuronal e a plasticidade sináptica, processos essenciais para a formação de novas conexões cerebrais e a adaptação às mudanças ambientais. O mecanismo exato por meio do qual o estrogênio modula o estresse do retículo endoplasmático ainda está sendo investigado, mas acredita-se que envolva a regulação de proteínas de choque térmico e outras moléculas que ajudam a restaurar a homeostase celular (Solum; Handa, 2002).

Ademais, o estrogênio pode regular a inflamação por mecanismos adicionais dependentes da sinovilina 1, uma proteína que participa da resposta imune e inflamatória. A

sinovilina 1 está envolvida na modulação da inflamação de células do sistema nervoso central, como os astrócitos e microglia, e pode ajudar a mitigar os efeitos nocivos da inflamação no cérebro (Hamson; Roes; Galea, 2016)

1.4 Neuroinflamação

A inflamação é uma resposta imunológica que ocorre na presença de agentes infecciosos ou outros estímulos nocivos, sendo mediada por dois tipos principais de ativação imunológica como a inata e adaptativa. O sistema imunológico inato representa a primeira linha de defesa, sendo composto por células que circulam constantemente e patrulham o organismo, prontas para reagir de maneira rápida. Os receptores dessas células são ativados ao reconhecerem padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs). A ativação desses receptores desencadeia a produção de citocinas, substâncias que mediam a resposta inflamatória. O sistema imunológico adaptativo, por sua vez, é ativado quando células especializadas reconhecem抗ígenos apresentados por patógenos, dando início a uma resposta imune mais específica e duradoura, mediada por células apresentadoras de抗ígenos (Beurel; Toups; Nemeroff, 2020).

As células do SNC responsáveis pela defesa a danos são chamadas de células gliais. As micróglia, por exemplo, possuem funções semelhantes às dos macrófagos, exercendo papel imunomodulador. Os astrócitos, representam o maior número, têm funções essenciais no suporte trófico, metabólico e estrutural dos neurônios (Khurgel; Ivy, 1996; Sofroniew, 2005). Além disso, os astrócitos formam uma rede complexa, interconectando-se por meio de junções comunicantes, o que permite a execução coordenada das suas atividades nas diferentes regiões do SNC. Eles desempenham funções cruciais, como a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica, o fornecimento de suporte metabólico aos neurônios, a modulação da composição do fluido intersticial e a regulação da troca de íons e moléculas entre o sangue e o cérebro (Manu et al., 2023)

As células PC12, que podem ser diferenciadas em neurônios, são amplamente utilizadas para estudar a neurotoxicidade de substâncias. Elas permitem avaliar diversos aspectos da função neuronal, como a sobrevivência celular, o crescimento de neuritos, danos ao DNA e alterações nos níveis de expressão de proteínas. A popularidade das células PC12 se deve à sua versatilidade, facilidade de cultura e ao grande conhecimento pré-existente sobre seu processo de proliferação e diferenciação (Jameson et al., 2000).

No contexto da neuroinflamação, células do sistema imunológico inato, como

micróglia e macrófagos, interagem com citocinas e sinais inflamatórios provenientes da periferia, levando à produção de substâncias inflamatórias no SNC (Mikova et al., 2001).

A ativação de micróglia e astrócitos desempenha um papel crucial nessa resposta, liberando tanto moléculas citotóxicas quanto neurotróficas que modulam processos como migração, adesão e proliferação celular (Polazzi; Monti, 2010; Abraham et al., 2008).

Segundo um estudo de meta-análise com quase 10.000 pacientes, demonstram que medicamentos anti-inflamatórios podem melhorar os sintomas depressivos, reforçando a relação entre transtornos mentais e neuroinflamação. Esses efeitos são mediados pela interação de citocinas inflamatórias com neurotransmissores, como a serotonina (Kohler et al., 2014).

A serotonina (5-HT), um neurotransmissor essencial na regulação do humor, é sintetizada a partir do aminoácido triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH). Entretanto, a inflamação altera o metabolismo do triptofano, desviando-o para a via quinurenina por meio da ação das enzimas indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO). Essa mudança reduz a disponibilidade de triptofano para a síntese de serotonina, comprometendo sua concentração nas fendas sinápticas (Belleau; Treadway; Pizzagalli, 2019). As citocinas pró-inflamatórias acessam o SNC por vias como, via humoral, a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) aumenta, permitindo a entrada de citocinas circulantes, como o TNF- α ou a via neural, citocinas periféricas influenciam diretamente a atividade de células nervosas (Tracey, 2002).

Outro neurotransmissor afetado pela neuroinflamação é o glutamato, crucial para a excitotoxicidade observada em várias condições neurológicas. A ativação da IDO resulta em níveis elevados de quinurenina, cujos metabólitos, como o ácido quinolínico, estimulam os receptores NMDA do glutamato, promovendo a liberação excessiva de cálcio e danos neuronais (Belleau; Treadway; Pizzagalli, 2019).

Além dos efeitos diretos sobre neurotransmissores, citocinas inflamatórias prejudicam a neurogênese e a neuroplasticidade, reduzindo a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fundamental para a saúde neuronal e a adaptação ao estresse (Fakra; Marotte, 2021).

Acerca disso, a neuroinflamação está envolvida em doenças neuropsiquiátricas pelo desequilíbrio de citocinas e do microambiente do SNC, sendo assim estudos buscam simular essa inflamação por meio de uma endotoxina bacteriana lipopolisacarídeo *Escherichia coli* para compreender melhor essa via e essa interação.

1.4 Lipopolisacarídeo

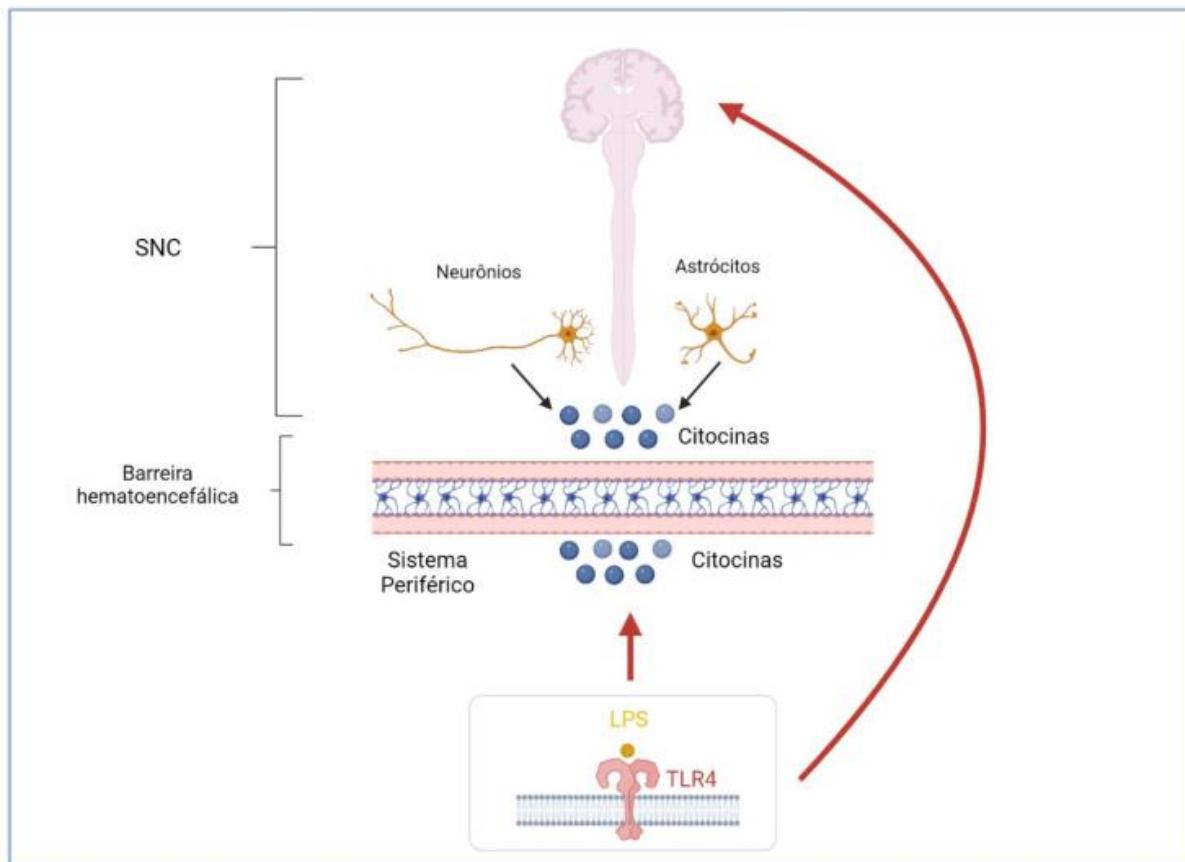
O lipopolisacarídeo (LPS) endotoxina bacteriana é uma molécula que se encontra abundantemente na membrana externa das bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*. É reconhecido molecularmente pelo sistema imunológico do hospedeiro através do receptor tipo *Toll-like* (TLR4), ativando uma tempestade de citocinas que ativa a resposta imune periférica e após uma exposição prolongada ativa a resposta imune do SNC, conforme mostrado na (Figura 1). O lipídio A, uma das três regiões da molécula do LPS, representa o centro imunorreativo do LPS devido ao reconhecimento específico e muito sensível desta estrutura por numerosos componentes celulares e humorais da imunidade inata.

Sua estrutura química se diferencia entre as espécies de bactérias, mesmo dentro da mesma espécie. Essas diferenças, e outras geradas dependendo do meio em que as bactérias se desenvolvem, podem resultar no reconhecimento mais fraco do lipídeo A, evadir a resposta imune inata e afetar a imunidade adaptativa (Fujifilm, 2017).

Com essa ativação da resposta imune as células da imunidade são ativadas como a micróglia e outras células do SNC que são moduladores positivos e cruciais de várias funções como a manutenção da neuroplasticidade. No entanto, uma atividade inflamatória excessiva ou prolongada de citocinas perturba múltiplas funções neuronais, incluindo comprometimento da sinalização, interrupção da síntese, recaptação e liberação de neurotransmissores, podendo assim gerar comportamentos tipos depressivos (Beurel; Toups; Nemeroff, 2020).

Sendo assim, ressalta-se que os distúrbios depressivos são marcados por profundas alterações na estrutura, função e responsividade cerebral, e por isso, há maior incapacidade dos pacientes em se adaptarem ao ambiente. Assim, as mudanças metabólicas que ocorrem durante os episódios de depressão sugerem que há predominância em determinadas estruturas, como o hipocampo que é uma região extremamente estudada na depressão, e áreas que modulam ou inibem a expressão emocional (côrtex pré-frontal), enquanto outras áreas de processamento sensorial e atenção estão desativadas (côrtex pré-frontal dorsolateral) (Engelhardt, 2004).

Figura 1: Interação do sistêmico periférico com o SNC e a produção de citocinas.



Fonte: autoria própria

LPS (lipopolisacarídeo) ao se ligar ao seu receptor TLR4 (toll-like 4), ativa uma tempestade de citocinas e que consequentemente ativam o sistema imune periférico e do SNC.

1.6 Baricitinibe

O baricitinibe é um inibidor seletivo e reversível das enzimas Janus quinase (JAK) 1 e 2. Essas enzimas desempenham um papel crucial na transdução de sinais intracelulares, essenciais para a regulação de diversos processos celulares, como a hematopoiese e a resposta inflamatória. As JAKs atuam por meio da fosforilação e subsequente ativação de substratos, ativadores de transcrição conhecidos como STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). A ativação de STATs resulta na expressão de genes reguladores de processos celulares vitais, incluindo a resposta a citocinas, que está associada à modulação de diversas patologias inflamatórias.

A via JAK/STAT tem sido amplamente estudada, especialmente em modelos que

exploram as respostas neuronais e gliais a lesões no SNC. Diante disso, é plausível considerar que a via JAK/STAT, particularmente a sinalização mediada por JAK2/STAT3, desempenha um papel crítico na indução e manutenção da depressão de longa duração, uma vez que essa forma de plasticidade sináptica depende diretamente da integridade funcional de mecanismos moleculares relacionados à sinalização glutamatérgica e à atividade inflamatória no SNC. A ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) na região CA1 do hipocampo, essencial para a depressão de longa duração, está sujeita à modulação por fatores neuroimunes, como as citocinas pró-inflamatórias, cujos níveis elevados foram associados à disfunção sináptica e à redução da neurogênese em modelos animais de depressão (Shariq et al., 2019).

Evidências sugerem que determinados domínios sintomáticos, como sintomas somáticos, anedonia e fadiga, podem estar particularmente associados a mecanismos mediados pela via JAK/STAT. Essa hipótese é reforçada por estudos com pacientes portadores de doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide, nos quais a elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias correlaciona-se com comportamentos típicos de doença, os quais parecem ser modulados por essa via de sinalização (Malemud; Miller, 2008).

Sendo assim a principal indicação terapêutica do baricitinibe é o tratamento de artrite reumatoide ativa em adultos, particularmente nos casos de artrite de moderada a grave intensidade. Além disso, o medicamento é aprovado para o tratamento de dermatite atópica moderada a grave, uma condição inflamatória crônica da pele. O baricitinibe foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para administração oral uma vez ao dia, com doses usuais de 2 mg e 4 mg, e é comercializado pela empresa Eli Lilly do Brasil Ltda.

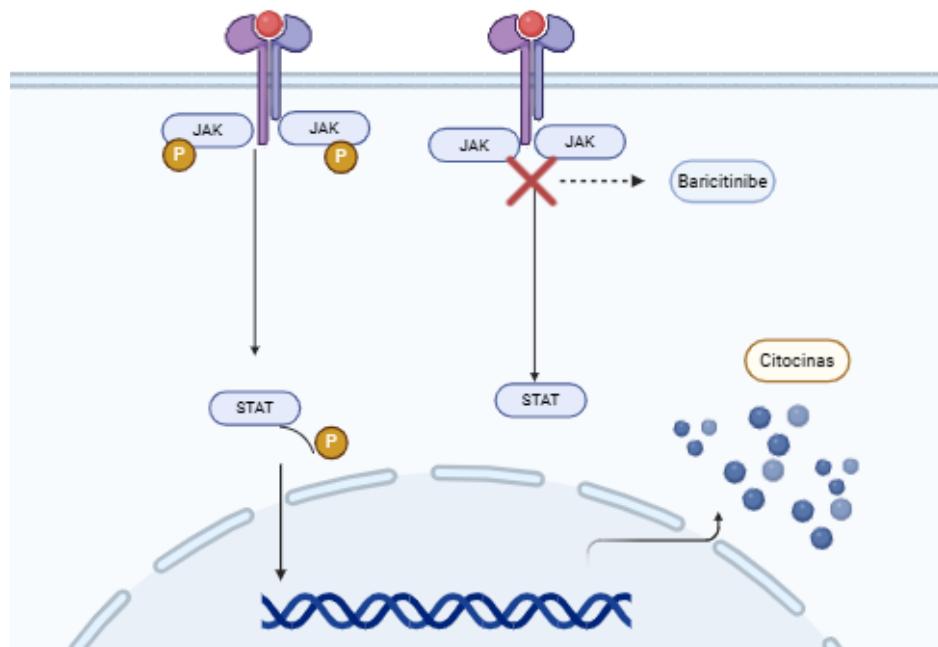
Artrite reumatoide e dermatite atópica são doenças inflamatórias crônicas que têm sido associadas a um risco elevado de comorbidades psiquiátricas, como depressão e ansiedade. Estudo realizado por Thyssen et al. (2022) demonstrou que pacientes com dermatite atópica moderada a grave frequentemente apresentam comorbidades emocionais, como ansiedade e depressão. No referido estudo, foi observada uma melhoria significativa não apenas nos sintomas dermatológicos, mas também nos sintomas emocionais associados, após a administração de baricitinibe nas doses de 2 mg e 4 mg. Esses achados sugerem uma possível relação entre processos inflamatórios periféricos e manifestações neuropsiquiátricas.

Adicionalmente, em modelos experimentais com animais infectados pelo HIV, o baricitinibe demonstrou reverter anormalidades comportamentais em testes de reconhecimento de objetos, sugerindo que o fármaco pode atuar no (SNC). A farmacocinética linear do baricitinibe no cérebro, evidenciada por esses estudos, implica em um acúmulo sustentado do

fármaco em concentrações adequadas para exercer efeitos anti-inflamatórios e anti-HIV no SNC. Esse acúmulo sugere que, no estado estacionário, o baricitinibe mantém níveis terapêuticos suficientes para afetar tanto a resposta inflamatória como as disfunções neurocognitivas (Gavegnano et al., 2019).

Em síntese, o baricitinibe, além de sua ação bem estabelecida em doenças inflamatórias periféricas, como a artrite reumatoide e a dermatite atópica, apresenta potencial terapêutico no manejo de comorbidades neuropsiquiátricas associadas à inflamação, além de efeitos promissores no tratamento de distúrbios cognitivos no contexto de infecções virais crônicas. Esses achados reforçam a necessidade de mais investigações sobre o impacto de inibidores de JAK no SNC e suas aplicações terapêuticas em doenças neuropsiquiátricas.

Figura 2: Representação do mecanismo de ação do BARI e sua interação com as citocinas.



Fonte: autoria própria

JAK são enzimas Janus quinase que são ativadas em resposta inflamatória, as enzimas são fosforizadas representada pela letra P, conforme a imagem e ativam as STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). A ativação de STATs resulta na expressão de genes reguladores de processos celulares vitais, incluindo a resposta a citocinas.

2 JUSTIFICATIVA

Os transtornos mentais representam o principal agravo de doenças, superando outras condições crônicas. Estima-se que as doenças neuropsiquiátricas sejam responsáveis por aproximadamente um terço da carga global de incapacidade, com a depressão sendo a condição com maior impacto. Esse panorama destaca a crescente relevância da compreensão dos fatores subjacentes às patologias neuropsiquiátricas, dado o impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos (Rocha; Hara; Paprocki, 2015).

Nessa condição há uma preocupação, pois estima-se que cerca de dois terços dos pacientes com depressão não apresentem resposta adequada ao tratamento inicial com antidepressivos e que, aproximadamente, 30% dos pacientes não respondam a múltiplas intervenções farmacológicas (Li et al., 2021).

Nesse contexto, estudos sobre os transtornos mentais vem crescendo e buscando reforçar outras hipóteses envolvidas na fisiopatologia da depressão. Estudos indicam que pacientes com dermatite atópica, estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, possivelmente devido à interação entre a inflamação sistêmica e alterações no ambiente cerebral, resultando em disfunção neuronal e afetando negativamente o estado emocional e cognitivo dos pacientes (Giridharan, et al., 2023).

Diante dessa problemática, esse estudo tem como objetivo aprofundar a compreensão do BARI, um medicamento cuja ação já demonstrou melhorias significativas nos sintomas de depressão e ansiedade em pacientes com dermatite atópica (Thyssen et al., 2022). Embora seu uso na clínica já seja bem estabelecido em condições inflamatórias, ainda são pouco explorados os mecanismos que se relacionam essa substância com SNC e sua potencial influência nos transtornos mentais.

Para abordar essa lacuna, este estudo buscou investigar esses efeitos do BARI no SNC, primeiramente em testes *in vitro* e em seguida, em testes comportamentais e avaliação de citocinas hipocampais em camundongos para avaliar seus possíveis efeitos na depressão, ansiedade e cognição. Compreender melhor essa interação do BARI com o SNC poderá contribuir para os avanços do conhecimento na área, mas também poderia abrir novas possibilidades terapêuticas. O objetivo é oferecer perspectivas translacionais e oferecer melhoria na qualidade de vida em pacientes que convivem com transtornos mentais associado a doenças inflamatórias.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os efeitos do baricitinibe (BARI) sobre as alterações comportamentais, celulares e neuroquímicas em modelo de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo.

3.2 Específicos

- Avaliar o potencial protetor BARI contra os danos celulares induzidos por LPS em células PC12 e astrócitos a fim investigar os perfis de morte celular, estresse oxidativo e despolarização mitocondrial.
- Determinar os efeitos do BARI nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) em células PC12 e astrócitos desafiados com LPS.
- Avaliar o efeito do BARI sobre as alterações comportamentais relacionadas ao processo inflamatório induzido por LPS nos testes campo aberto, placa perfurada, nado forçado e reconhecimento de objetos.
- Analisar o potencial do BARI sobre as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 no hipocampo dos camundongos submetidos ao LPS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias utilizadas

4.1.1 Baricitinibe

O baricitinibe (OLUMIANT[®]) foi obtido por meio de doações nos Hospitais São José, Waldemar de Alcântara e Hospital Geral de Fortaleza. A dose utilizada nos testes *in vivo* foi determinada a partir de estudos que definiram 10 mg/kg como dose experimental, escalonada para humanos em 2 mg (Reece et al., 2021). Para o preparo, o comprimido revestido foi desintegrado com auxílio de uma seringa e dissolvido em água destilada, sendo a solução preparada diariamente durante os experimentos.

Nos testes *in vitro*, o seguinte protocolo: um comprimido de 4 mg de BARI foi dissolvido em 5 ml de DMSO (solução mãe, contendo 100% de DMSO). Em seguida, 7,5 µl da solução mãe foram adicionados a 150 µl de PBS, formando a solução de trabalho. Para o experimento, 40 µl dessa solução foram adicionadas no primeiro poço e nos demais foi realizada diluição seriada, após o teste de ensaio de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) foram selecionadas as concentrações de trabalho 1,25 µM, 0,63 µM, 0,31 µM.

4.1.2 Lipopolissacarídeo

Para a indução da inflamação sistêmica, foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA). Todas as soluções foram preparadas dissolvendo o LPS em solução salina estéril a 0,9%. A seleção das doses nos experimentos *in vivo* seguiu dados prévios da literatura: a dose de 0,5 mg/kg foi baseada em estudo realizado por Oliveira (2021) com o mesmo grupo de pesquisa, enquanto a dose de 1 mg/kg foi adotada conforme descrito por Ali et al. (2020).

Para os experimentos *in vitro*, as células foram tratadas com LPS na concentração de 50 µg/mL, diluído em tampão salino fosfatado (PBS) estéril, com pH ajustado para 7,4. A escolha dessa concentração foi fundamentada em dados previamente publicados por Rebouças (2024).

4.1.3 Antidepressivo de referência

Para o controle nos testes *in vivo* foi utilizado o antidepressivo oxalato de escitalopram ou fluoxetina (EMS[®]) que foram dissolvidos em solução salina 0,9%, obtendo-se a dose de 10mg/kg. A dose foi definida com base em estudos anteriores com modelo animal (Ali et al., 2020).

4.2 Testes *In vitro*

Os testes *in vitro*, todos foram realizados em colaboração com o laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), com apoio do Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

4.2.1 Manutenção e cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas foram de feocromocitoma de rato, células PC12 (Apabcam, Rio de Janeiro, RJ, BRA) e astrócitos de murinos, isoladas e atribuídas pelo grupo da Universidade Federal de São Paulo (Erustes et al 2018).

As células PC12 constituem uma linhagem derivada de feocromocitoma da glândula adrenal de rato, originalmente estabelecida a partir de um meduloblastoma adrenal transplantável (Greene e Tischler, 1976). Como células de origem catecolaminérgica, as PC12 possuem a capacidade de sintetizar, armazenar e liberar catecolaminas, especialmente dopamina e norepinefrina. Sob estímulo do fator de crescimento nervoso (NGF), essas células sofrem diferenciação, adquirindo características semelhantes às de neurônios simpáticos. Essa diferenciação se reflete em mudanças morfológicas e funcionais, como a emissão de prolongamentos celulares, formação de estruturas análogas a sinapses e desenvolvimento de propriedades de excitabilidade elétrica (Xie et al., 2023).

Por sua vez, os astrócitos, células amplamente distribuídas na substância cinzenta e branca do cérebro e da medula espinhal, apresentam notável heterogeneidade morfológica e funcional. Eles desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase do sistema nervoso central (SNC). A maioria das sinapses no SNC encontra-se envolta por prolongamentos perissinápticos de astrócitos, estruturas ultrafinas que constituem um "berço astrogial" essencial para a formação, maturação e manutenção das conexões sinápticas. Esses

prolongamentos são ricamente dotados de transportadores que regulam os níveis de íons e neurotransmissores na fenda sináptica, além de fornecerem suporte metabólico local e atuarem na remoção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo assim para a proteção neuronal e o equilíbrio do microambiente sináptico (Verkhratsky, Nedergaard e Leif, 2015).

As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino em garradas de cultivo de polietileno (75cm², volume de 250mL), incubadas na estufa com as seguintes condições: temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, e o crescimento foi observado, em microscópio de inversão, a cada 24 horas.

Após as células atingirem cerca de 80% de confluência, o meio de cultura foi cuidadosamente removido. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato) estéril para remover resíduos e componentes do meio. Para desprender as células da superfície do frasco, foi utilizada tripsina a 0,05% em uma solução de EDTA a 0,53 mM. A tripsina facilita o desligamento das células, enquanto o EDTA auxilia na remoção de íons que contribuem para a adesão celular.

Uma vez em suspensão, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer, um tipo de hemocitômetro específico para esta finalidade. Para avaliar a viabilidade celular, utilizou-se o corante azul de Tripan. Este corante é excluído por células viáveis com membranas integrais; no entanto, ele penetra em células inviáveis, cuja membrana perdeu a integridade, tingindo-as de azul. Dessa forma, na contagem foram consideradas apenas as células não coradas, indicativas de viabilidade.

Posteriormente, as células viáveis foram subcultivadas em placas de diferentes tamanhos, de acordo com a necessidade do experimento: em placas de 96 poços, com uma concentração de 1×10^5 células/mL, e em placas de 24 poços, com uma concentração de 5×10^4 células/mL.

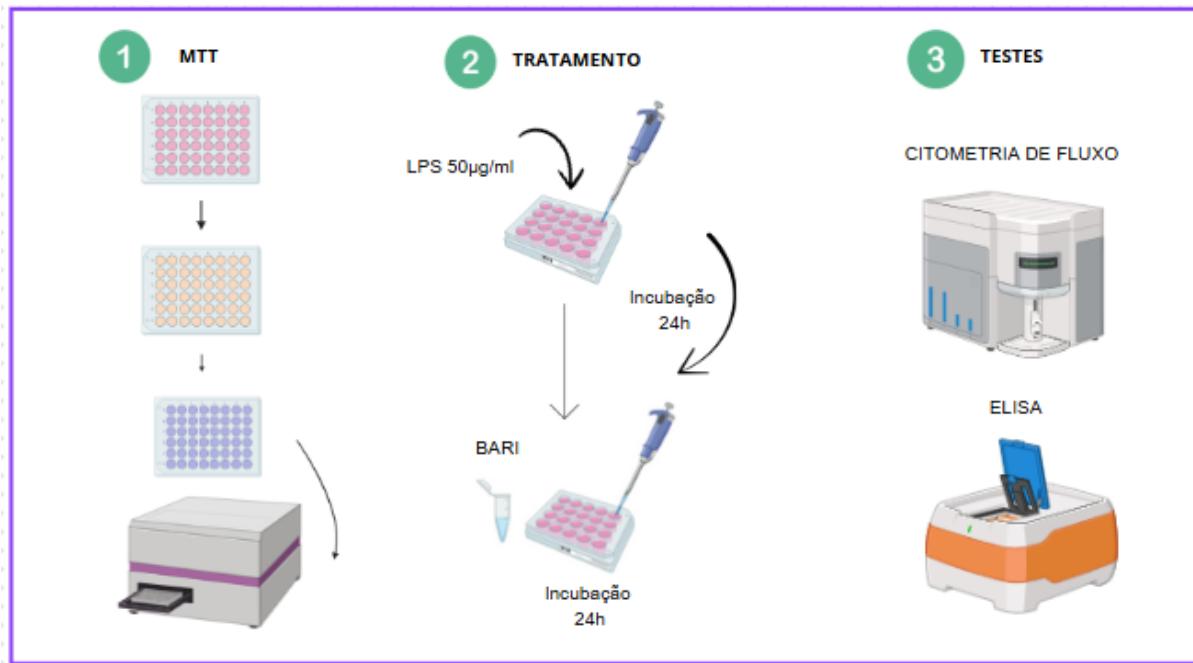
4.2.3 Delineamento Experimental

O protocolo experimental foi elaborado com o objetivo de investigar os efeitos do BARI em astrócitos e células PC12 após a exposição ao LPS. Inicialmente, foi determinada a concentração ideal de BARI para avaliação da viabilidade celular e a citotoxicidade das substâncias. Com base no estudo realizado por Gavegnano et al. (2019), que demonstrou ausência de toxicidade em concentrações entre 0,001 M e 10 M, esse trabalho selecionou para os experimentos uma faixa de concentrações de 5 µM a 0,08 µM, visando melhor adequação ao modelo celular utilizado.

As células foram primeiramente expostas ao LPS por 24 horas para indução de uma resposta inflamatória. Em seguida, iniciou-se o tratamento com BARI nas concentrações previamente estabelecidas ($5 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$, $1,25 \mu\text{M}$, $0,625 \mu\text{M}$, $0,31 \mu\text{M}$, $0,16 \mu\text{M}$ e $0,08 \mu\text{M}$), mantendo-se a exposição combinada ao LPS + BARI por mais 24 horas.

Após esse período, foram realizadas análises para avaliação dos seguintes parâmetros: morte celular, alterações no potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e níveis de citocinas pró-inflamatórias. O delineamento experimental detalhado está ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Delineamento Experimental dos experimentos in vitro.



Fonte: autoria própria

4.2.4 Teste de viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade do baricitinibe nas linhagens celulares PC12 e astrócitos, foi realizado o teste de redução do MTT [Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], conforme descrito por Mosmann (1983).

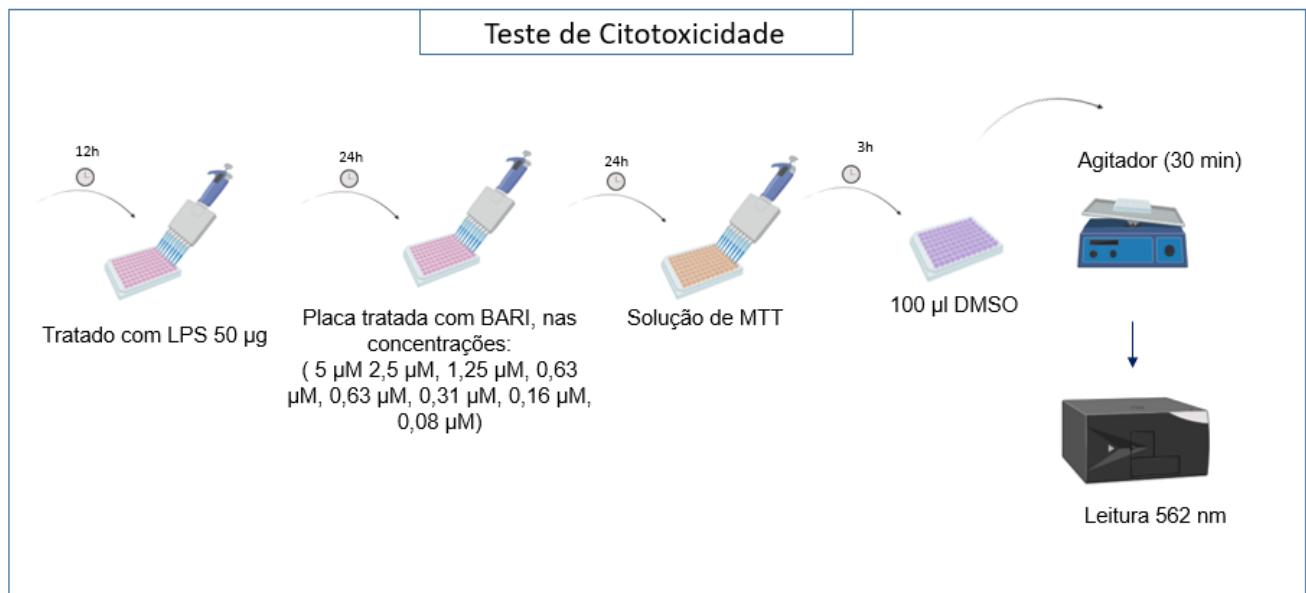
Primeiro, as células foram cultivadas como previamente descrito e plaqueadas em uma concentração de 1×10^5 células /mL em placas de 96 poços, onde permaneceram incubadas *overnight* a fim de garantir aderência na placa. Em seguida, foi adicionado o baricitinibe nas concentrações de 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,63 μM , 0,31 μM , 0,16 μM e 0,08 μM . A placa foi incubada por 24h.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (2800 rpm, 5 minutos, a 25°C) e lavadas com PBS. Em cada poço, foi adicionada uma solução de MTT (concentração de 5 mg/mL, em um volume de 10%), e as placas foram incubadas por 3 horas. O MTT, um composto amarelo, foi reduzido em células viáveis pela ação de desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas, formando cristais de formazan, de cor roxa.

Ao final da incubação, o sobrenadante foi descartado, e 100 μL de DMSO puro foi adicionado para lisar as células e dissolver o formazan. A placa foi colocada em um agitador por 30 minutos para homogeneização e, por fim, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 562 nm, conforme mostrado na figura 4.

Para avaliar os danos causados por LPS, utilizamos a técnica de citometria de fluxo, que permite analisar as características físicas e moleculares de células em suspensão. Esse método organiza as células em um único fluxo, permitindo que elas passem individualmente por um feixe de luz. A interação entre as células e o feixe gera sinais que são captados por detectores e posteriormente processados e analisados. Dessa forma, conseguiu-se avaliar a conformidade e integridade das células tratadas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS, ou seja, células que receberam apenas LPS, comparando-as com o grupo controle (células não tratadas com LPS) quanto com o grupo tratado com LPS seguido de baricitinibe as mesmas descritas anteriormente com base no ensaio de MTT. A análise foi realizada utilizando a marcação com 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) e a Anexina V conjungada com Ficoeritrina (ANX/PE), que indica apoptose e necrose celular.

Figura 4: Fluxograma das etapas do teste de viabilidade celular para avaliação da citotoxicidade do BARI.



Fonte: autoria própria

4.2.4 Avaliação da integridade de membrana e exposição da fosfatidilserina

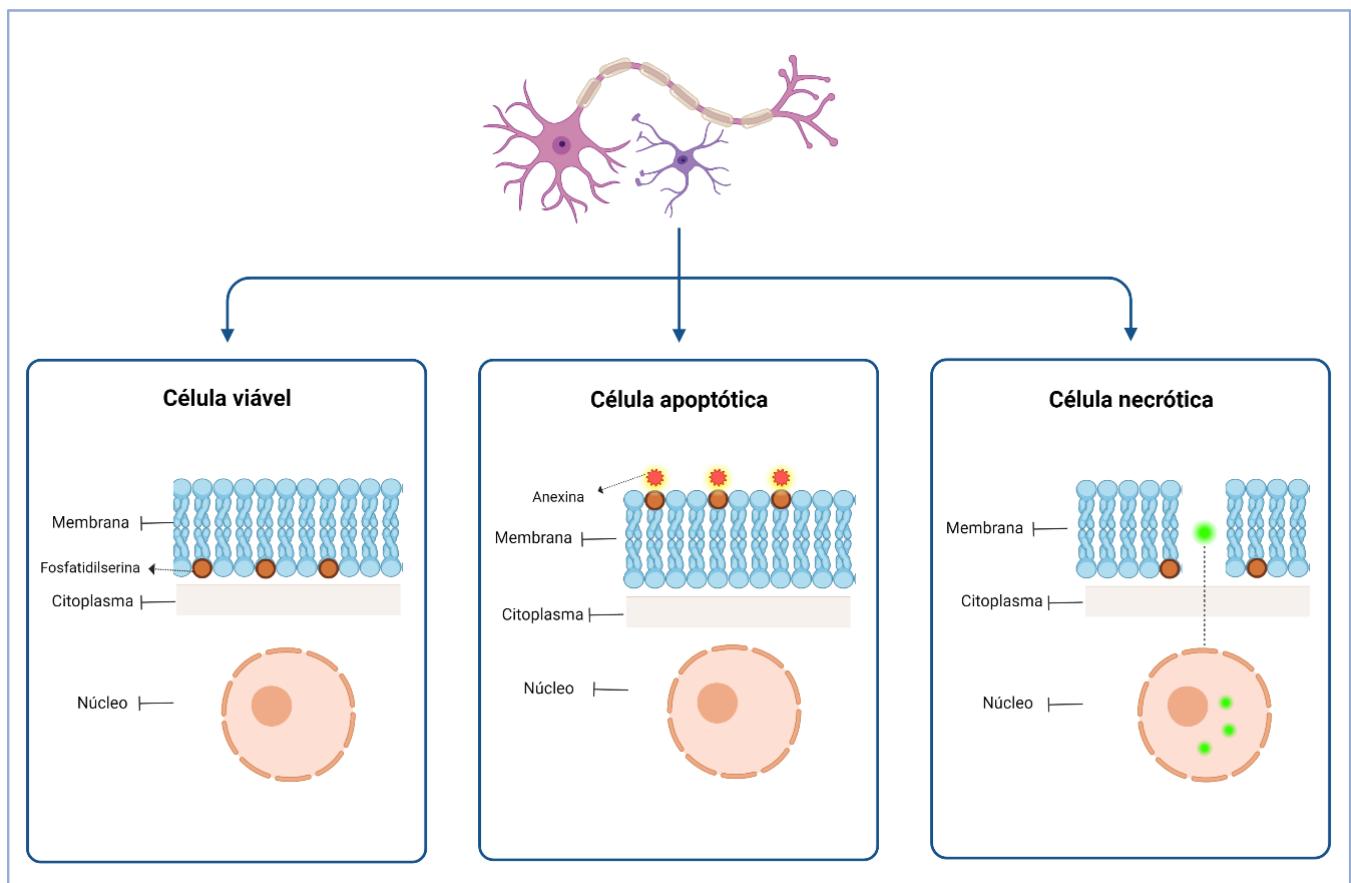
Para avaliar o mecanismo de morte celular foi utilizada os marcadores 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) e a Anexina V conjungada com Ficoeritrina (ANX/PE). A 7-AAD é um derivado fluorescente da actinomicina D, que quando é excitado no comprimento de onda 480nm emite uma fluorescência em 647nm. Esse fluorocromo intercala entre as fitas de DNA, porém em células viáveis é incapaz de atravessar a membrana plasmática, portanto quando as células apresentam a marcação significa que apresenta perda da integridade da membrana plasmática, características importantes para avaliar necrose celular (Chan; Mcculley; Kessel, 2017).

O marcador Anexina V, é amplamente utilizado para detectar apoptose em células. A anexina é uma proteína que tem afinidade pela fosfatidilserina que normalmente está localizada na face interna da membrana plasmática. Durante a apoptose a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana celular, tornando a ligação com anexina V possível (Figura 5).

Para executar a análise, as células foram suspensas com 50 µL de tripsina, e em seguida, foram centrifugadas (2800rmp/5 min/ 25°C) e foi adicionado 100µL de tampão de ligação e em seguida adicionou-se 5 µL / cada poço de (Anx+/7-AAD+). O procedimento foi realizado utilizando um kit comercial (*Anexin V PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences*). Após

15 minutos de incubação em ambiente sem luz, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no citômetro de fluxo (*FACSCalibur* – BD Biosciences). Para análise dos resultados, foram consideradas as células não marcadas como viáveis, células com dupla marcação são consideradas em processo apoptótico tardio, marcadas com Anexina V, indicativo de apoptose e com 7AAD, debris celulares (podendo ser sugestivo necrose), conforme representado na figura 5 (Rocha; Hara; Paprocki, 2015).

Figura 5: Demonstração do funcionamento do teste de marcação e avaliação de apoptose e necrose.



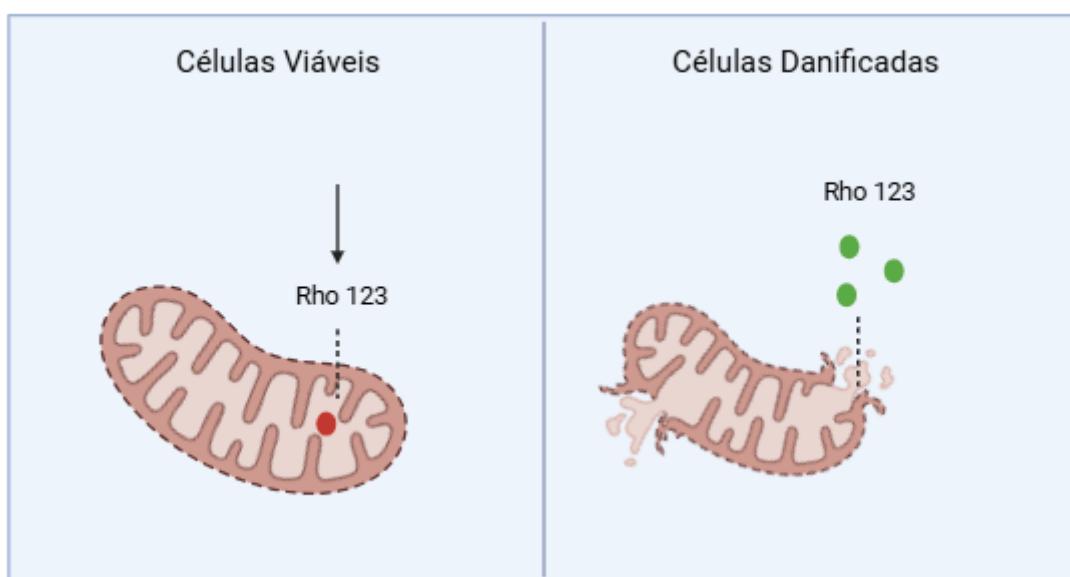
Fonte: Rebouças, 2024

4.2.5 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Ele é capaz de ligar-se à mitocôndria de células vivas. Por ser um corante fluorescente catiônico, torna-se permeável à membrana da célula, incorporando-se no interior da organela, já que possui elevado potencial elétrico negativo, emitindo fluorescência vermelha. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico induz o efluxo de Rodamina 123, reduzindo a fluorescência (Figura 6) (Johnson et al., 1980).

Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectados em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde no citoplasma comparado à fluorescência vermelha mitocondrial, indicando uma difusão da Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas (Figura 6). Sendo assim, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, dificultando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada através do filtro de fluorescência vermelha.

Figura 6: Representação do teste de análise do potencial transmembranar mitocondrial com o corante Rodamina 123.



Fonte: autoria própria

4.2.6 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no Citoplasma

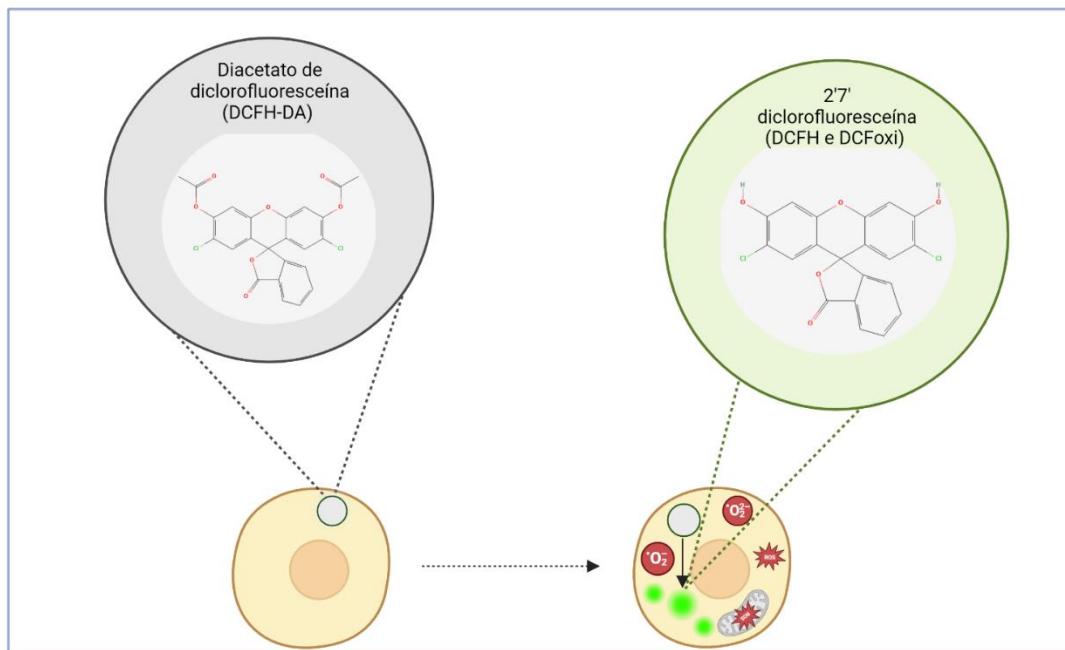
O ensaio baseia-se na introdução da sonda não fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) nas células, fornecendo um substrato oxidável (DCFH). O DCFH-DA é um composto estável e lipofílico, capaz de atravessar a membrana plasmática. No citoplasma, enzimas citosólicas, como as esterases, desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), que fica retida no citoplasma devido à sua polaridade. Espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH, formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCF-oxi), que emite fluorescência verde com excitação em 488 nm e detecção entre 515-545 nm sensor (Figura 7).

A intensidade da fluorescência verde produzida pela formação de DCF-oxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula, refletindo a quantidade de metabólitos oxidativos produzidos (Aranda et al., 2013).

O processo de marcação foi realizado no escuro. Doze horas antes da leitura, 10 µL de DCF foram adicionados a cada poço, seguido de incubação em estufa por 12 horas. No dia da leitura, as células foram tratadas com 100 µL de tripsina para suspensão, transferidas para tubos de eppendorf e centrifugadas (2800 rpm, 5 min, 25°C). O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 500 µL de PBS, centrifugadas novamente, e finalmente ressuspensas em 200 µL de PBS para leitura no citômetro.

Os resultados de DCFH e Rhodamina123 foram obtidos a partir da intensidade relativa de fluorescência, calculada com base nos valores absolutos de intensidade e expressa em média geométrica. A média do grupo controle foi atribuída como valor 1,0, e as médias dos demais grupos foram expressas em valores proporcionais (Pokorný et al., 2014).

Figura 7: Demonstração de como funciona o teste para análise de espécie reativa de oxigênio através da conversão de DCFH-DA em DCFH e DCF-oxi.



Fonte: Rebouças, 2024.

5.0.7 Avaliação dos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante das células

Para avaliar a atividade do baricitinibe na neuroinflamação, foi utilizado um ensaio imunológico (ELISA) comercial (Biolegend, EUA) para medir os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Os experimentos foram realizados com sobrenadantes de culturas celulares de PC12 e astrócitos, que foram divididos em três grupos experimentais: grupo LPS: recebeu apenas lipopolissacarídeo (LPS), grupo LPS + Baricitinibe: recebeu LPS e foi tratado com baricitinibe, grupo controle: apenas as células sem nenhum tratamento. As etapas do teste de ELISA, foram seguidos conforme o manual do fabricante.

4.3 Testes *in vivo*

4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com peso entre 14 e 20 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em condições controladas, com temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram alojados em gaiolas ventiladas, com 5 camundongos por gaiola, e apenas fêmeas para esse trabalho foram incluídas no rack para garantir a sincronia do ciclo estral. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

Os experimentos seguiram os princípios éticos de experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, sob o número 2015120523, conforme detalhado no Anexo A.

4.3.2 Delineamento experimental

Os animais passaram por um período de adaptação necessário antes da realização dos testes experimentais. Para a sincronização do ciclo estral, os camundongos foram mantidos na mesma estante, em caixas próximas, porém sem contato direto com outros animais, de modo a sincronizar seus ciclos.

Após o período de adaptação, foi iniciado o protocolo experimental, cujo objetivo era avaliar os efeitos do BARI em um modelo de inflamação induzido por LPS. Foram realizados três protocolos sendo que no protocolo 1 teve como foco a análise comportamental de parâmetros relacionados à atividade exploratória, ansiedade, cognição e sintomas depressivos. Foram utilizados os testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e teste do nado forçado. Adicionalmente, foi testado um protocolo experimental não previamente explorado pelo grupo de pesquisa desse trabalho, a exposição contínua ao LPS por cinco dias. O antidepressivo de referência utilizado para comparação foi a fluoxetina, conforme estabelecido em estudos anteriores (Ali et al., 2020).

Visando aprofundar a avaliação dos efeitos ansiolíticos e antidepressivos, este protocolo incluiu os testes de campo aberto, nado forçado e o teste da placa perfurada. Neste protocolo, utilizou-se o escitalopram como antidepressivo positivo controle. Além disso, a dose de LPS foi aumentada com o intuito de investigar se uma intensidade maior da inflamação poderia

provocar alterações comportamentais mais evidentes, especialmente em relação ao fenótipo depressivo.

Considerando que a exposição ao LPS por cinco dias utilizada nos protocolos anteriores, não foi suficiente para induzir um comportamento depressivo nos animais, assim o protocolo 3, optou-se por um regime prolongado de administração do LPS por dez dias consecutivos conhecido pelo grupo de pesquisa desse trabalho, analisado por Oliveira, 2021. O objetivo foi verificar se uma exposição inflamatória mais duradoura poderia gerar alterações comportamentais mais consistentes, permitindo a caracterização de um modelo mais fidedigno de depressão induzida por inflamação.

Protocolo 1

Neste protocolo, os camundongos receberam injeções intraperitoneais diárias de LPS 0,5 mg/kg durante 5 dias e uma hora após cada administração de LPS, os animais foram tratados por via oral com solução salina (controle), baricitinibe (10 mg/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg). Os grupos experimentais ($n=8-10$ animais) (Figura 8).

- Controle (CT): animais foram submetidos à uma administração (i.p) diária de solução salina 0,9% e a mesma solução por via oral durante os 5 dias.
- SAL+ BARI: animais receberam salina (i.p) uma vez ao dia e baricitinibe 10mg/kg por (v.o) durante 5 dias.
- SAL+FLU: animais receberam uma vez ao dia injeções (i.p) de solução salina 0,9% e fluoxetina (10mg/kg) por (v.o) durante 5 dias.
- LPS 0,5mg/kg + SAL: foram tratados com LPS 0,5mg/kg (i.p) uma vez ao dia e salina (v.o) durante 5 dias.
- LPS 0,5mg/kg + BARI 10mg/kg: receberam uma vez ao dia LPS (i.p) e BARI (v.o) durante 5 dias.
- LPS 0,5mg/kg + FLU 10mg/kg: receberam LPS (i.p) uma vez ao dia e FLU (v.o) durante 5 dias.

Apenas no protocolo 1 foi realizado o teste reconhecimento de objetos, pois os resultados indicaram que o LPS induziu déficit cognitivo no protocolo de cinco dias, e que o BARI apresentou não reverteu esse déficit. Nos demais protocolos, buscou-se compreender a atividade do BARI nos comportamentos preditivos de depressão e ansiedade, uma vez que, no primeiro protocolo, essa atividade não foi observada.

Protocolo 2

O procedimento foi semelhante ao descrito no Protocolo 1, com a diferença de que, neste caso, o controle antidepressivo padrão foi substituído por escitalopram (10 mg/kg) em vez de fluoxetina e a dose do LPS foi usada a de 0,5mg/kg ou 1mg/kg conforme ilustrado na Figura 9.

- Controle (CT): animais receberam injeções i.p de solução salina 0,9% e mesma solução por via oral durante 5 dias.
- LPS 0,5mg/kg + SAL: receberam LPS 0,5mg/kg (i.p) e salina (v.o) durante 5 dias.
- LPS 1mg/kg + SAL: receberam LPS 1mg/kg (i.p) e salina (v.o) durante 5 dias.
- LPS 0,5mg/kg + BARI 10mg/kg: receberam LPS (i.p) e BARI (v.o) durante 5 dias.
- LPS 1mg/kg + BARI 10mg/kg: receberam LPS (i.p) e BARI (v.o) durante 5 dias.
- LPS 0,5mg/kg + ESC 10mg/kg: receberam LPS (i.p) e ESC (v.o) durante 5 dias.

Protocolo 3

Neste protocolo de maior duração, os camundongos receberam LPS (0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p) por 10 dias. A partir do 6º dia, iniciou-se a administração oral diária de solução salina (controle), baricitinibe (10 mg/kg) ou escitalopram (10 mg/kg), realizada uma hora após a injeção de LPS, sendo mantido este tratamento mantido até 10º dia do experimento (Figura 10). Os grupos, contendo 8-10 animais por grupos que estão representados a seguir:

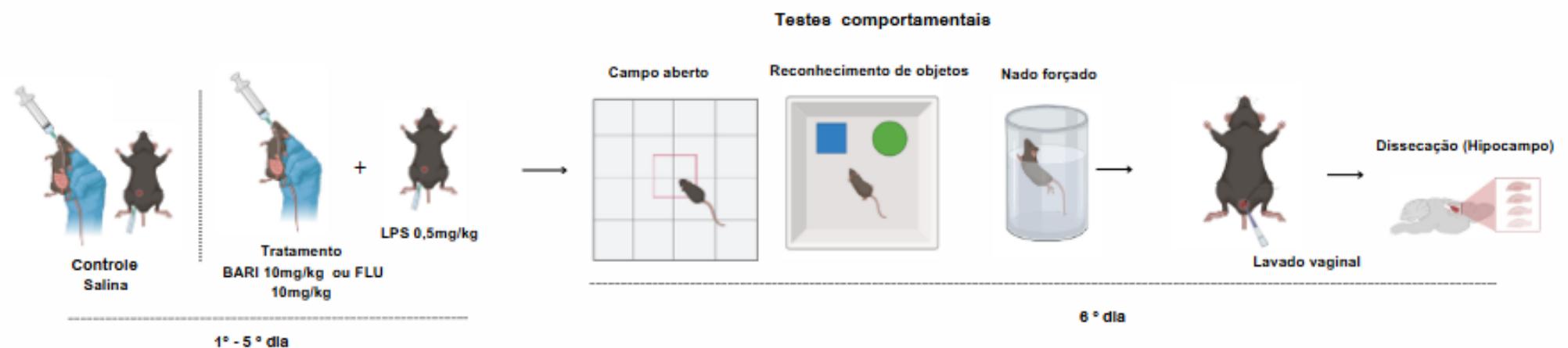
- Controle (CT): animais receberam injeções (i.p) de solução salina 0,9% e mesma solução por (v.o) durante 10 dias.
- LPS 0,5mg/kg + SAL: foram tratados com LPS 0,5mg/kg (i.p) uma vez ao dia durante dez dias e no 6º ao 10º receberam solução salina (v.o).
- LPS 0,5mg/kg + BARI 10mg/kg: foram tratados com LPS 0,5mg/kg (i.p) uma vez ao dia durante dez dias e no 6º ao 10º receberam baricitinibe (v.o).
- LPS 0,5mg/kg + ESC 10mg/kg: receberam com LPS 0,5mg/kg (i.p) uma vez ao dia durante dez dias e no 6º ao 10º receberam escitalopram (v.o).

Nos protocolos 1 e 2 (duração de 5 dias), os camundongos foram submetidos a testes comportamentais no 6º dia; enquanto que no protocolo 3 (duração de 10 dias), esses testes foram realizados no 11º dia. Esses testes buscavam avaliar os efeitos dos tratamentos na atividade e no comportamento dos animais.

Depois dos testes comportamentais, os animais foram submetidos a uma análise do ciclo estral, feita por meio de lavado vaginal. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados, e a área dissecada do cérebro foi o hipocampo, para posterior realização das análises neuroquímicas.

Figura 8: Delineamento experimento do protocolo 1 de exposição ao LPS 0,5mg/kg durante 5 dias.

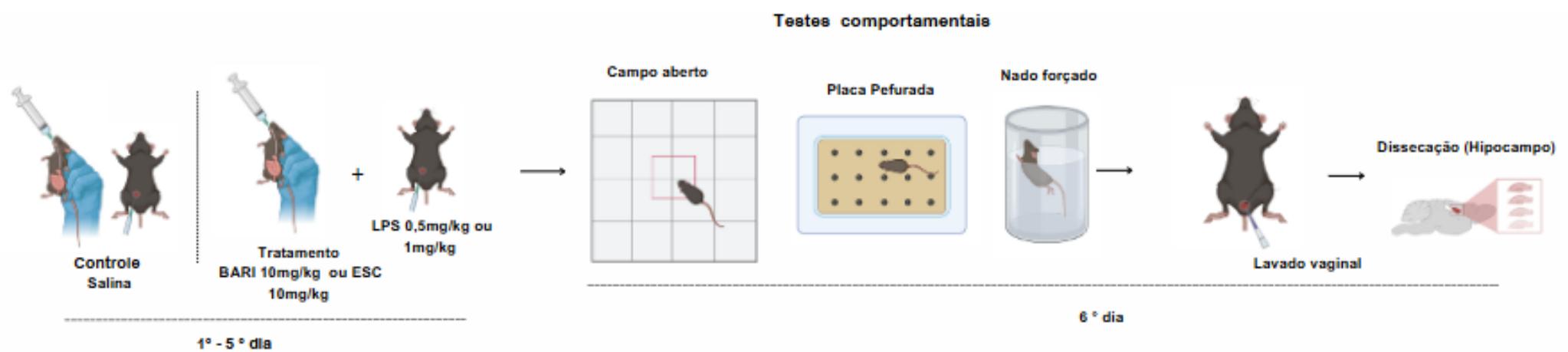
Protocolo 1:



Fonte: autoria própria

Figura 9: Delineamento experimento do protocolo 2 de exposição ao LPS 0,5mg/kg ou LPS 1mg/kg durante 5 dias.

Protocolo 2:



Fonte: autoria própria

Figura 10: Delineamento experimento do protocolo 3 de exposição ao LPS 0,5mg/kg durante dez dias.

Protocolo 3:



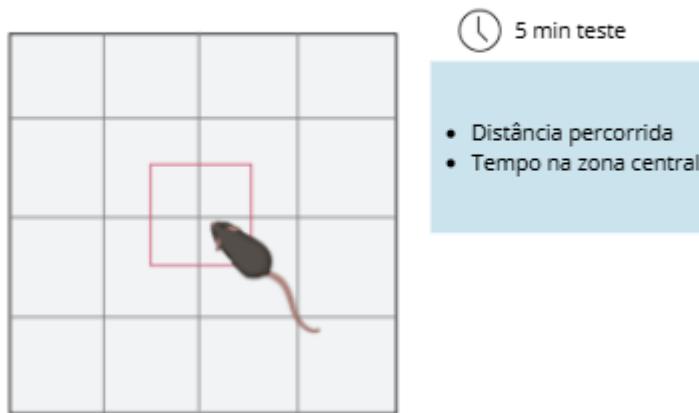
Fonte: autoria própria

4.4 Testes Comportamentais

4.4.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto foi realizado em um aparato quadrangular com dimensões de 32 cm x 32 cm. Cada animal foi colocado individualmente no centro do dispositivo e teve 6 minutos para explorar livremente o ambiente, sendo 1 min de adaptação e 5 minutos de teste. Durante o experimento, foram observados e registrados os seguintes parâmetros comportamentais: distância percorrida e o tempo na zona central. Após cada sessão, o aparelho foi higienizado com uma solução de álcool diluído para evitar interferências entre os testes. Todo o procedimento foi gravado e posteriormente analisado utilizando o software *Anymaze*, garantindo maior precisão nos resultados (Figura 11) (Chem; Lit; Archer 1973).

Figura 11: Demonstração do teste campo aberto



Fonte: autoria própria

4.4.2 Teste Nado Forçado

O teste do nado forçado é considerado um teste padrão ouro para averiguar o comportamento depressivo-símile em roedores. Trata-se de um teste no qual o animal é colocado individualmente em cilindros de acrílico contendo água (altura: 35 cm; diâmetro: 24 cm) com temperatura entre 25-27°C, durante 6 minutos, sendo (1 min de adaptação e 5 min de teste) evitando o desconforto. O teste avalia o comportamento de desesperança e/ou desmotivação do animal, mensurado pelo tempo de imobilidade, considerado este parâmetro quando o animal faz apenas movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. Todo o procedimento foi gravado e posteriormente analisado utilizando o *software Anymaze*, garantindo maior precisão nos resultados (Figura 12) (Porsolt et al., 1978).

Figura 12: Teste nado forçado

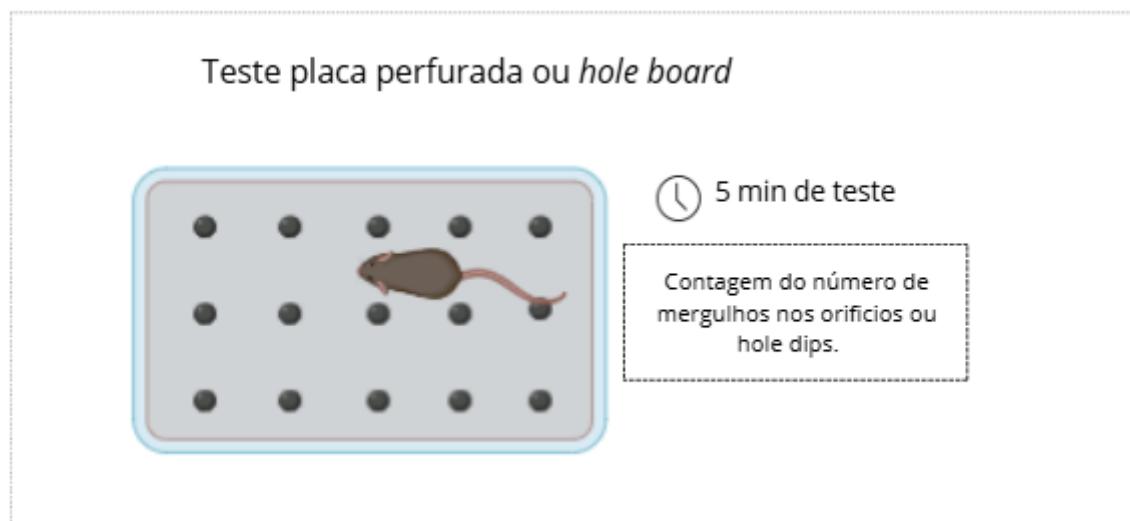


Fonte: autoria própria

4.4.3 Teste da placa perfurada

O teste da placa perfurada utilizado para avaliar o comportamento exploratório em camundongos foi o proposto por File e Wardill, (1975). Este teste apresenta um aparato quadrangular de 20 x 20 cm com 16 orifícios espaçados uniformemente, suspenso a uma altura de 45cm aproximadamente. Durante 5 minutos foi avaliado, individualmente, a frequência em que o animal colocou a cabeça dentro dos orifícios, também denominado de “mergulhos” ou *head dips*. Tal teste é importante para avaliar o comportamento ansioso dos animais, visto que os animais possuem medo de altura, e de locais abertos, dessa forma quanto maior a frequência de exposição aos orifícios, menor o comportamento ansioso-símile (Figura 13).

Figura 13: Teste placa perfurada



Fonte: autoria própria

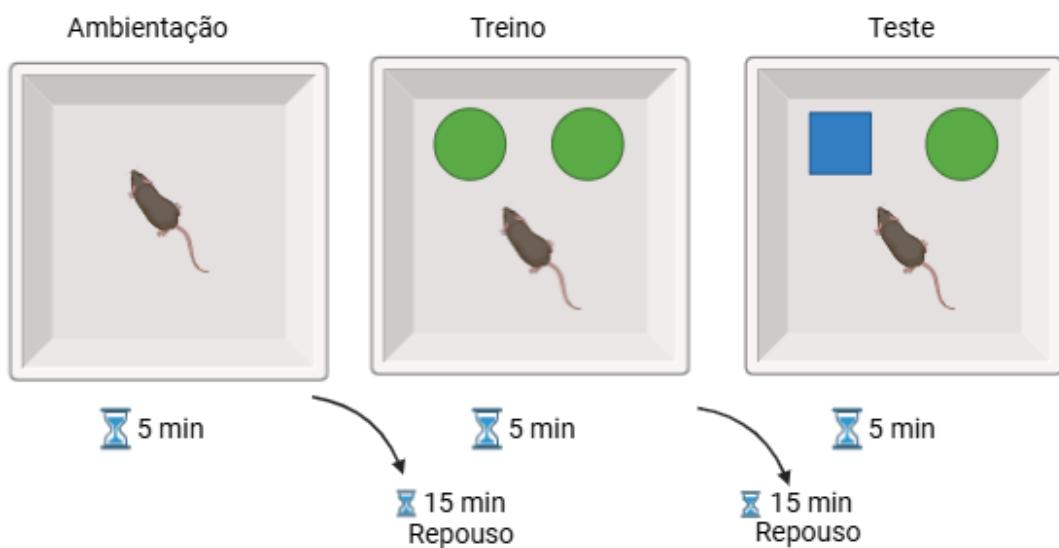
4.4.5 Teste de Reconhecimento do objeto novo

Este teste é baseado na tendência natural dos animais a buscarem o novo (Ennanceur; Delacour, 1988). Inicialmente, os animais foram habituados e colocados em um aparato de acrílico (30x30x15) durante 5 minutos. Posteriormente, eles foram retirados e submetidos a outra caixa por 15 minutos, até o início da fase de treino.

Nesta fase de treino, o animal foi colocado novamente no aparato de acrílico contendo 2 objetos iguais (OI) e durante 5 minutos, foi permitido explorar o ambiente e os objetos. Após 15 min de intervalo, ocorreu efetivamente o teste, o animal foi colocado novamente na arena teste e um dos objetos iguais foi substituído pelo objeto novo (ON). Durante 5 minutos, o tempo que o animal explorou cada um dos objetos foi anotado (Aquino et al., 2020) (Figura 14). O resultado foi expresso como índice de reconhecimento a um objeto novo, sendo obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de reconhecimento: } (\text{tempo ON} - \text{tempo OI}) / (\text{tempo ON} + \text{tempo OI})$$

Figura 14: Teste reconhecimento de objetos



Fonte: autoria própria

4.4.6 Determinação do Ciclo Estral

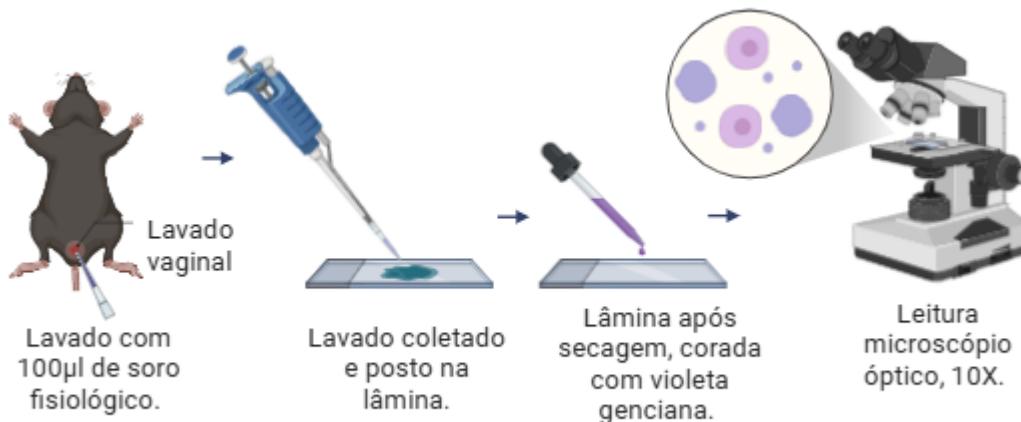
O ciclo reprodutivo dos roedores, conhecido como ciclo estral, tem uma duração média de 4 a 5 dias. Em camundongos, esse ciclo é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, durante as quais os níveis de estrogênio variam significativamente (Marcondes; Bianchi; Tanno, 2002). A determinação da fase do ciclo estral é considerada fundamental, uma vez que os níveis hormonais, especialmente o estrogênio, podem interferir diretamente nos resultados experimentais (Rocks; Cham; Kundakovic, 2022). A identificação da fase do ciclo foi realizada por meio do método de lavagem vaginal seguido da análise citológica do esfregaço.

No esfregaço vaginal, predominam células epiteliais superficiais com núcleo arredondado, células epiteliais cornificadas e leucócitos, sendo que a composição celular varia conforme a fase do ciclo estral. Durante o proestro, observa-se uma predominância de células epiteliais nucleadas, caracterizadas por núcleos bem arredondados. Na fase de estro, predominam células epiteliais cornificadas. No metaestro, há a presença de células cornificadas associadas a um aumento no número de leucócitos. Por fim, no diestro, verifica-se um elevado número de leucócitos acompanhado por células epiteliais nucleadas (Zhao et al., 2012).

O procedimento experimental envolveu a realização de um lavado vaginal com 100 µL de soro fisiológico a 0,9%. Para isso, a ponteira foi cuidadosamente posicionada próximo à entrada do canal vaginal do animal, permitindo a lavagem sem o despejo direto do soro. O processo foi repetido até que a máxima quantidade de células dispersas no muco fosse coletada, seguindo-se a coloração e identificação celular conforme o protocolo descrito por (McLean; Byrne; Kerlin, 2012). Após a secagem, os esfregaços foram corados com Violeta Cristal a 0,1% e analisados em microscópio óptico com objetiva de 10x, possibilitando a observação dos tipos celulares presentes e a identificação da fase do ciclo estral (Figura 15).

Esse método detalhado possibilitou uma avaliação das fases do ciclo estral, essencial para compreender possíveis interferências do ciclo nos comportamentos analisados.

Figura 15: Demonstração do protocolo lavado vaginal.



Fonte: autoria própria

4.5 Teste neuroquímico

4.5.1 Dosagem de Citocinas

A área dissecada foi o hipocampo, posteriormente homogeneizada em tampão PBS (8 volumes) contendo inibidor de protease (EMD Biosciences). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi coletado para análise. A concentração das citocinas IL-6 e TNF- α foi determinada utilizando o método ELISA (R&D® Systems, Minneapolis, MN, EUA), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em volumes de 50 μ L, e os resultados foram expressos em pg/g de tecido.

4.6 Análise estatística

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

5.0 RESULTADOS

5.1 Testes *In vitro*

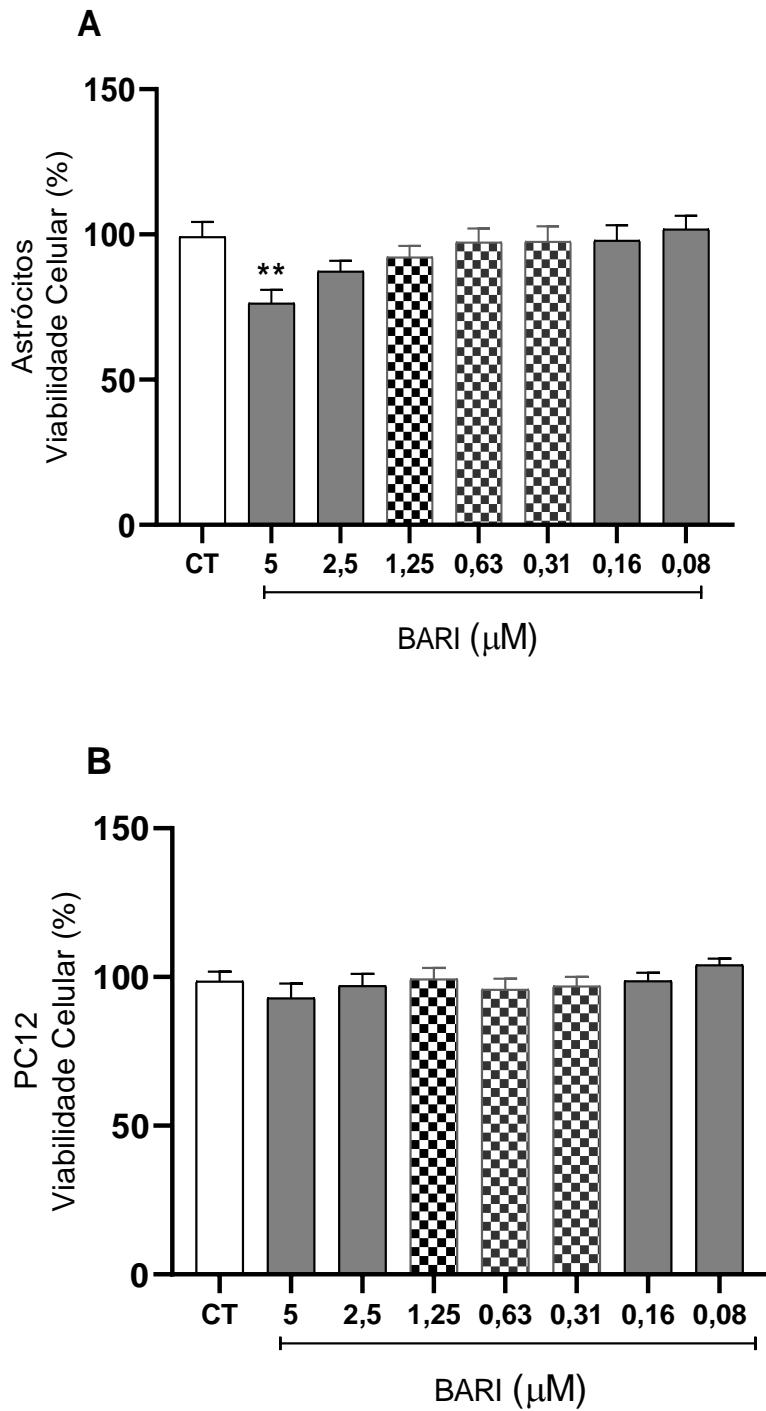
5.0.1 Teste de viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade do BARI foi realizada em células das linhagens de astrócitos e PC12, utilizando o ensaio de MTT após 24 horas de exposição. As concentrações testadas em ambas as linhagens foram 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,63 µM, 0,31 µM, 0,16 µM e 0,08 µM. Nos astrócitos, os resultados de viabilidade celular foram (CT: 99,24 ± 5,07; 5 µM: 76,29 ± 4,7; 2,5 µM: 87,29 ± 3,7; 1,25 µM: 92,15 ± 3,91; 0,63 µM: 97,28 ± 4,82; 0,31 µM: 97,57 ± 5,30; 0,16 µM: 97,98 ± 5,19; 0,08 µM: 101,8 ± 4,66), observando-se que apenas a concentração de 5 µM reduziu significativamente a viabilidade celular quando comparada ao grupo controle, sugerindo toxicidade nesta concentração as demais concentrações não causaram redução significativa na viabilidade celular, indicando ausência de toxicidade (Figura 16 A).

Nas células PC12, os resultados foram (CT: 98,51 ± 3,27; 5 µM: 92,88 ± 4,98; 2,5 µM: 97,12 ± 3,93; 1,25 µM: 99,30 ± 3,78; 0,63 µM: 95,86 ± 3,60; 0,31 µM: 96,96 ± 3,13; 0,16 µM: 98,73 ± 2,71; 0,08 µM: 104,0 ± 2,12), demonstrando que nenhuma das concentrações testadas causou redução significativa na viabilidade celular em comparação ao controle, indicando que o BARI não apresentou toxicidade nessas condições experimentais (Figura 16 B).

Com base nos resultados obtidos, optou-se por trabalhar com as concentrações de 1,25 µM, 0,63 µM e 0,31 µM para os experimentos subsequentes, tanto para astrócitos quanto para células PC12, já que estas concentrações demonstraram ausência de citotoxicidade significativa em ambas as linhagens celulares e são as três concentrações mais altas em comparação as demais.

Figura 16: Teste de viabilidade celular de redução de MTT analisando atividade do baricitinibe nos astrócitos (16 A) e células PC12 (16 B).



Os resultados são mostrados como média \pm EPM. ** $p < 0,05$ vs CT. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle negativo; BARI: baricitinibe.

5.0.2 Avaliação do mecanismo de Morte Celular

Para avaliar a integridade celular, utilizamos a marcação com Anexina V e 7-AAD, que distingue diferentes estados celulares com base na integridade da membrana. A marcação positiva para Anexina V (Anx⁺) indica apoptose inicial, enquanto o 7-AAD positivo (7-AAD⁺) é indicativo de morte celular.

A marcação dupla (Anx⁺; 7-AAD⁺) sugere apoptose tardia ou transição para necrose. Os grupos experimentais foram: CT (controle, células não tratadas), LPS (células tratadas com LPS 50 µg/mL) e LPS + BARI, nas concentrações de BARI 1 (1,25 µM), BARI 2 (0,63 µM) e BARI 3 (0,31 µM).

Nos astrócitos, foi observada uma redução percentual no número de células viáveis no grupo tratado apenas com LPS em comparação ao grupo controle. Por outro lado, o tratamento com BARI aumentou significativamente o quantitativo de células viáveis em relação ao grupo LPS (CT: 95,06 ± 0,09; LPS: 91,71 ± 0,18; LPS + BARI 1: 96,51 ± 0,11; LPS + BARI 2 : 94,78 ± 0,06; LPS + BARI 3: 94,78 ± 0,06) (Figura 17 A).

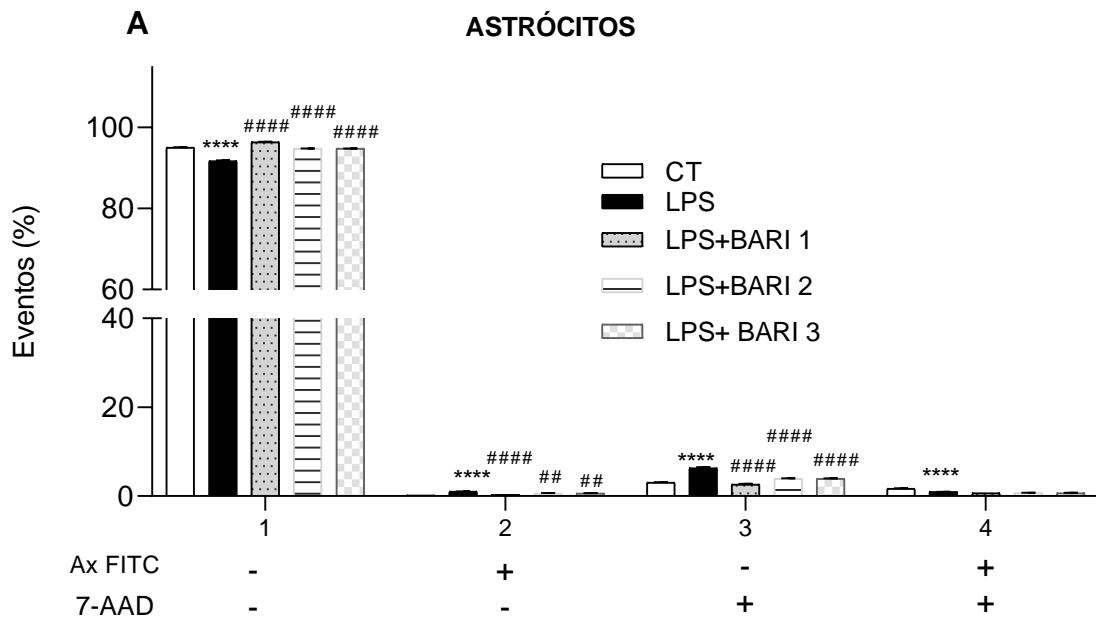
Analizando o processo de apoptose (Anx⁺; 7-AAD⁻), houve um aumento significativo no percentual nas células submetidas ao LPS em comparação com o controle, e a redução significativa desse dano foi visualizado após o tratamento com o BARI (CT: 0,18 ± 0,02; LPS: 1,01 ± 0,04; LPS + BARI 1: 0,33± 0,01; LPS + BARI 2: 0,62 ± 0,04; LPS + BARI 3: 0,62 ± 0,04). No processo de necrose (Anx⁺; 7-AAD⁻) o percentual foi significativo no grupo LPS em relação ao controle, mas o tratamento com BARI diminuiu de forma significativa esses níveis (CT: 3,06 ± 0,06; LPS: 6,33 ± 0,16; LPS + BARI 1: 2,65 ± 0,09; LPS + BARI 2: 3,91 ± 0,07; LPS + BARI 3: 3,91 ± 0,08). E na marcação dupla (Anx⁺/7AAD⁺), indicativa de apoptose tardia, foi menor nos grupos tratados com BARI, reforçando sua ação protetora contra a morte celular (CT: 1,69 ± 0,05; LPS: 0,95 ± 0,04; LPS + BARI 1: 0,68 ± 0,03; LPS + BARI 2: 0,72 ± 0,07; LPS + BARI 3: 0,72 ± 0,07) (Figura 17 A).

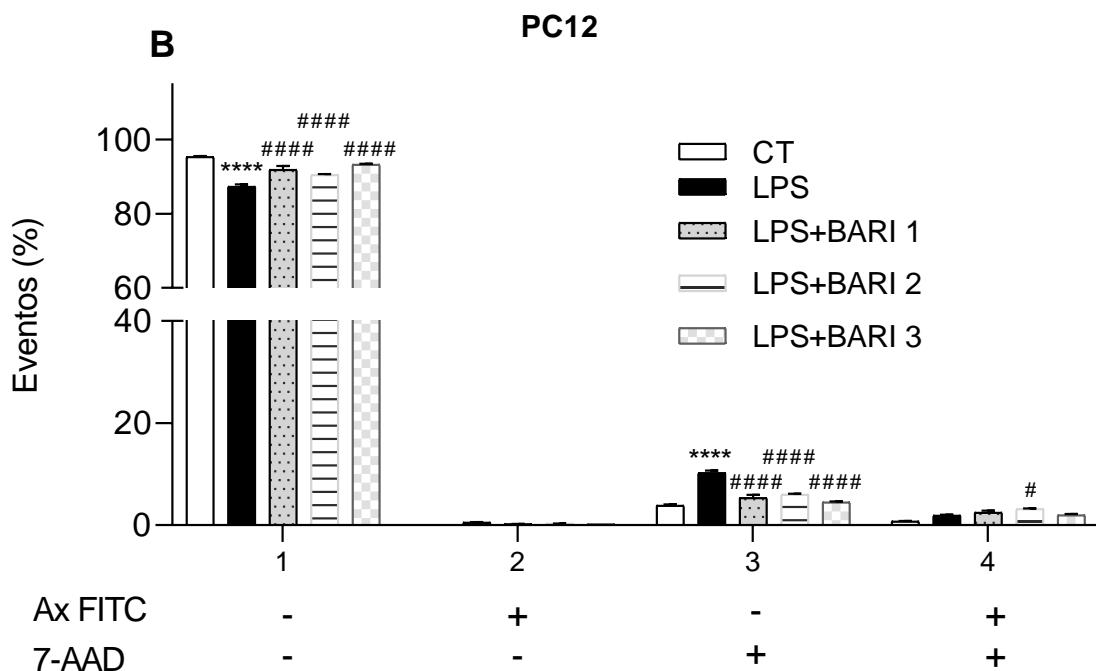
Na linhagem PC12, observamos uma redução nas células viáveis tratadas com LPS comparada com o grupo controle, quando tratadas com o BARI aumentou significativamente em relação ao grupo LPS (CT: 95,29 ± 0,22; LPS: 87,28 ± 0,58; LPS +BARI 1:91,89 ± 0,93; LPS + BARI 2: 90,49 ± 0,18; LPS + BARI 3:93,22 ± 0,22) (Figura 17 B).

No processo de apoptose (Anx⁺; 7-AAD⁻) ocorreu um aumento no percentual nas células submetidas ao LPS comparadas com o controle, e não houve redução significativa após o tratamento com o BARI (CT: 0,05 ± 0,00; LPS: 0,54 ± 0,06; LPS + BARI 1: 0,22± 0,04; LPS + BARI 2: 0,29 ±0,02; LPS + BARI 3: 0,24 ± 0,01) (Figura 17 B).

Já no processo de necrose o percentual foi significativo no grupo LPS em relação ao controle, mas o tratamento com BARI diminuiu de forma significativa esses níveis (CT: $3,88 \pm 0,22$; LPS: $10,24 \pm 0,48$; LPS + BARI 1: $5,39 \pm 0,55$; LPS + BARI 2: $5,99 \pm 0,15$; LPS + BARI 3: $4,53 \pm 0,14$). E na marcação dupla ($\text{Anx}^+/\text{7AAD}^+$), indicativa de apoptose tardia, foi maior no grupo LPS comparado com o grupo controle e nos grupos tratados, não evidenciou nenhum resultado significativo, exato na concentração BARI 3 que não foi capaz de reverter o efeito do LPS (CT: $0,78 \pm 0,02$; LPS: $1,93 \pm 0,08$; LPS + BARI 1: $2,50 \pm 0,37$; LPS + BARI 2: $3,21 \pm 0,05$; LPS + BARI 3: $2,01 \pm 0,17$) (Figura 17 B).

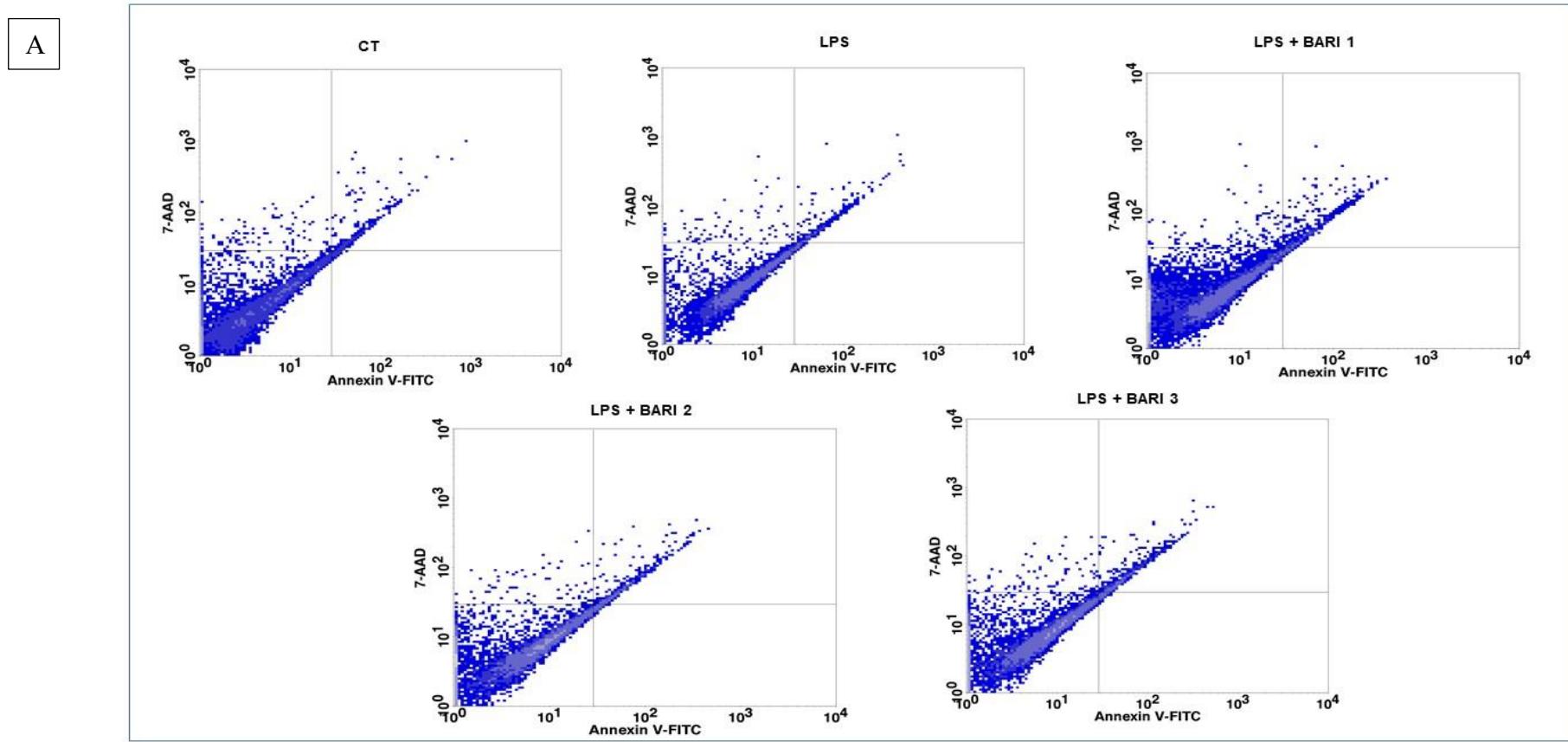
Figura 17: Análise da atividade do baricitinibe na morte celular, após a exposição do LPS.





Os resultados são mostrados como média \pm EPM $p<0,05$. CT vs **** $p<0,05$ LPS; BARI ##### $p<0,05$ vs LPS. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido por Tukey. CT: Controle negativo, LPS: Lipopolissacarídeo, BARI 1: Baricitinibe 1,25 μ M, BARI 2: Baricitinibe 0,63 μ M; BARI 3: Baricitinibe 0,31 μ M.

Figura 18: Gráficos de densidade mostram a avaliação comparativa da via de morte celular. Células necróticas foram marcadas com 7AAD, e apoptóticas com anexina V, em células PC12 e astrócitos.



B

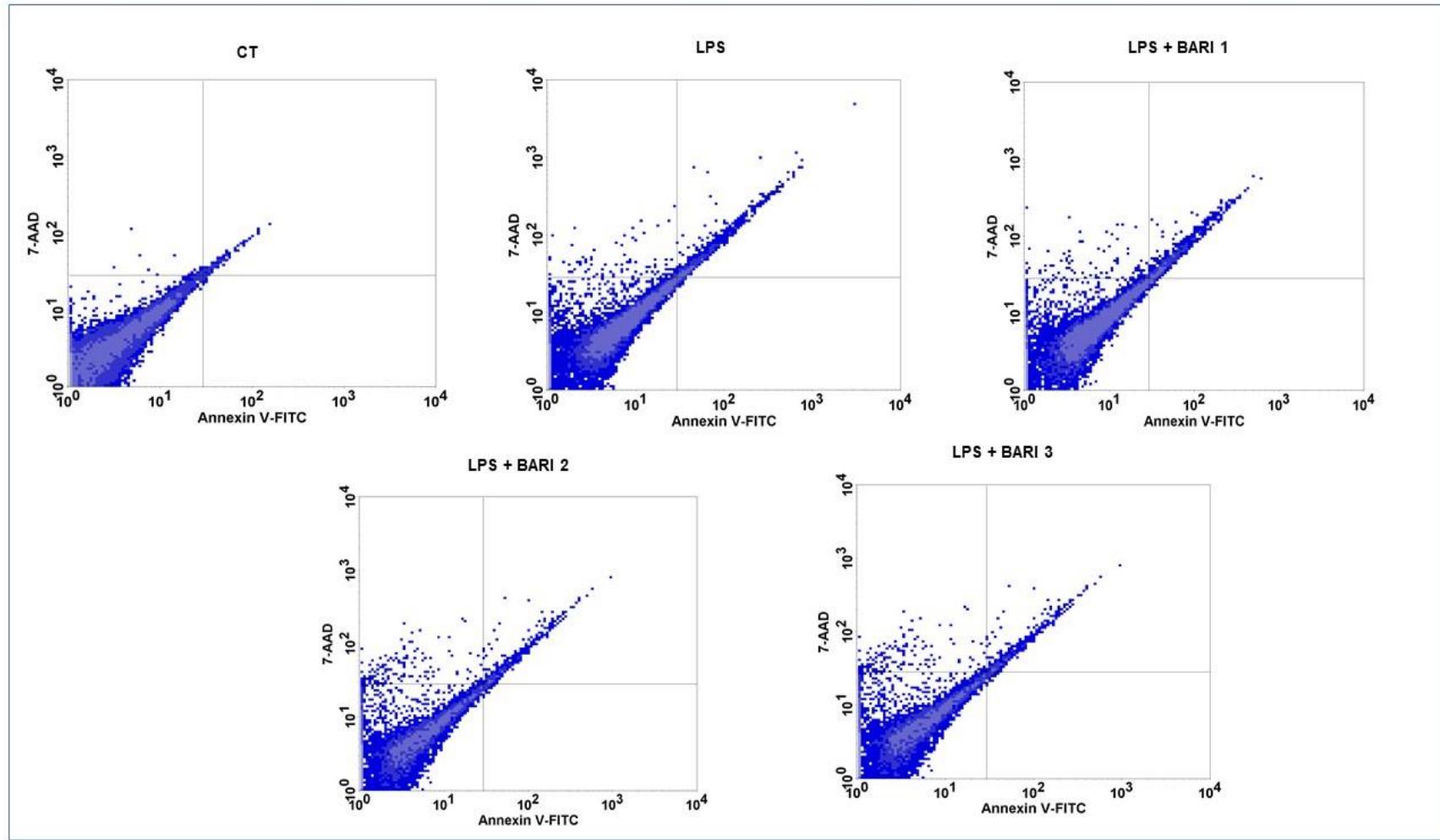
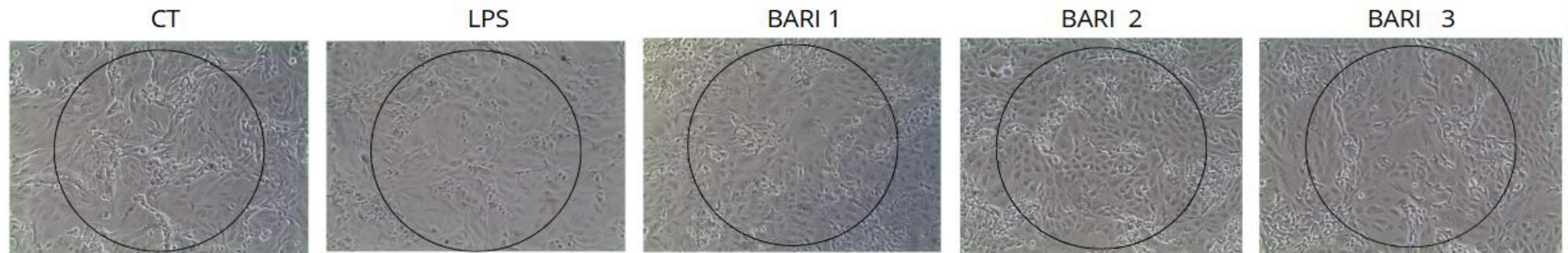


Gráfico A: Astrócitos e B: PC12, no eixo x anexina V, marca células com apoptose inicial, no eixo y marca células com apoptose tardia ou necrose celular. Ct: Células sem tratamento; LPS: Células tratadas com LPS, LPS + B1 1,25 μ M; LPS + B2 0,62 μ M; LPS + B3 0,31 μ M

Figura 19: Imagens microscópicas das células astrócitos e PC12

A



B

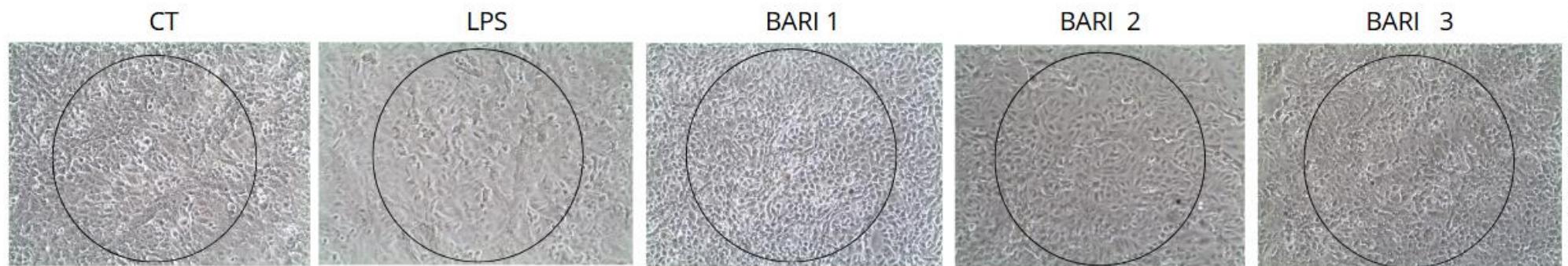


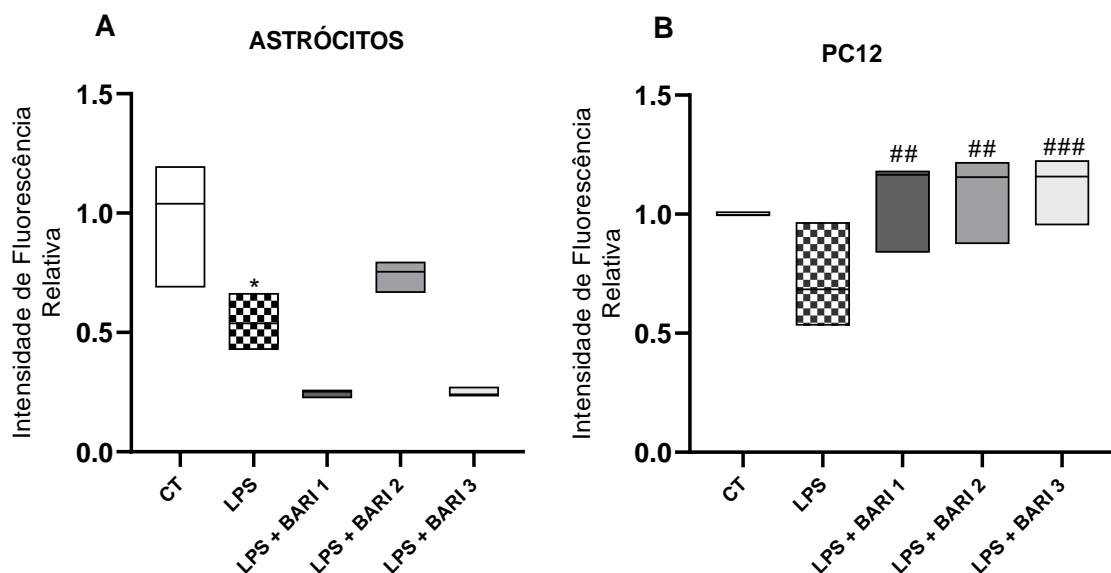
Figura A observamos os astrócitos e na Figura B as células PC12, em ambas nota-se o comportamento das mesmas expostas ao LPS e tratadas com o baricitinibe, comparado ao grupo controle, a área demarcada demonstra a densidade de células e suas principais diferenças entre os grupos analisados. CT: Controle, LPS: Lipopolissacárido, BARI 1: Baricitinibe 1,25 µM, BARI 2: Baricitinibe 0,63 µM; BARI 3: Baricitinibe 0,31 µM.

5.0.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Neste estudo, em células da linhagem de astrócitos, observou-se que o grupo tratado com LPS apresentou uma redução significativa na fluorescência, em comparação ao grupo controle, indicando que o LPS comprometeu a integridade mitocondrial. Nos grupos tratados com BARI, não houve reversão significativa do dano causado pelo LPS. Embora tenha sido observada uma melhora no grupo tratado com a concentração B2, essa diferença não foi estatisticamente significativa CT: 1,04 (0,75-1,17); LPS: 0,54 (0,45-0,63); LPS + BARI 1: 0,25 (0,21 -0,25); LPS + BARI 2: 0,75 (0,69 -0,76); LPS + BARI 3: 0,24 (0,21- 0,27) (Figura 20 A).

Na linhagem PC12, as células submetidas ao LPS também apresentaram redução na fluorescência em comparação ao grupo controle, porém, essa redução não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, os grupos tratados com BARI demonstraram aumento na fluorescência em relação ao grupo LPS, sendo este aumento estatisticamente significativo. Esses resultados sugerem que o BARI exerce uma atividade protetora nas células PC12 CT: 0,99 (0,99 – 1,00); LPS: 0,68 (0,65-0,79); LPS + BARI 1: 1,16 (0,84- 1,18); LPS + BARI 2: 1,15 (0,90 – 1,19); LPS + BARI 3: 1,16 (1,05 – 1,17) (Figura 20 B).

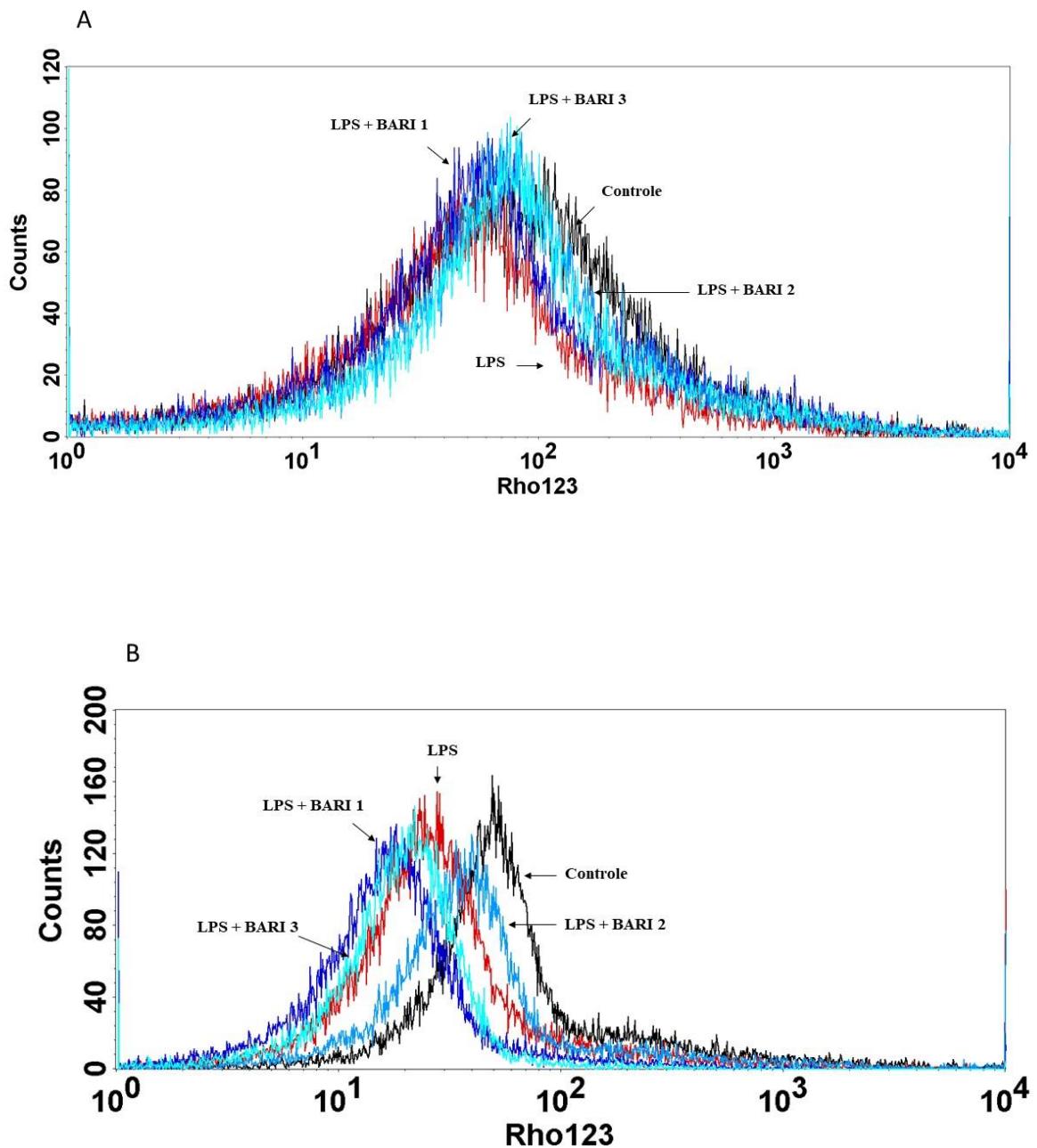
Figura 20: Avaliação da integridade mitocondrial, através da fluorescência.



Os valores estão representados como mediana (Percentil25-percentil 75). *p<0,05 vs CT; **p<0,05 vs LPS; ***p<0,05 vs LPS. Teste de Kruskall Wallis, seguido de Dunn. CT: Controle, LPS: Lipopolissacárido, BARI 1: Baricitinibe 1,25µM, BARI 2: Baricitinibe 0,63 µM; BARI 3: Baricitinibe 0,31 µM.

Figura 21– Histograma representativo do ensaio de Rodamina123 demonstrando o potencial transmembrânico

mitocondrial em células astrócitos (A) e PC12 (B).



Em A e B estão apresentados o grupo controle em preto, LPS em vermelho e o grupo tratado com baricitinibe nas tonalidades de azul, sendo o mais escuro BARI 1 ($1,25 \mu\text{M}$), azul mais claro BARI 3 ($0,31 \mu\text{M}$). Os picos representam a contagem de eventos (células) e suas respectivas fluorescências.

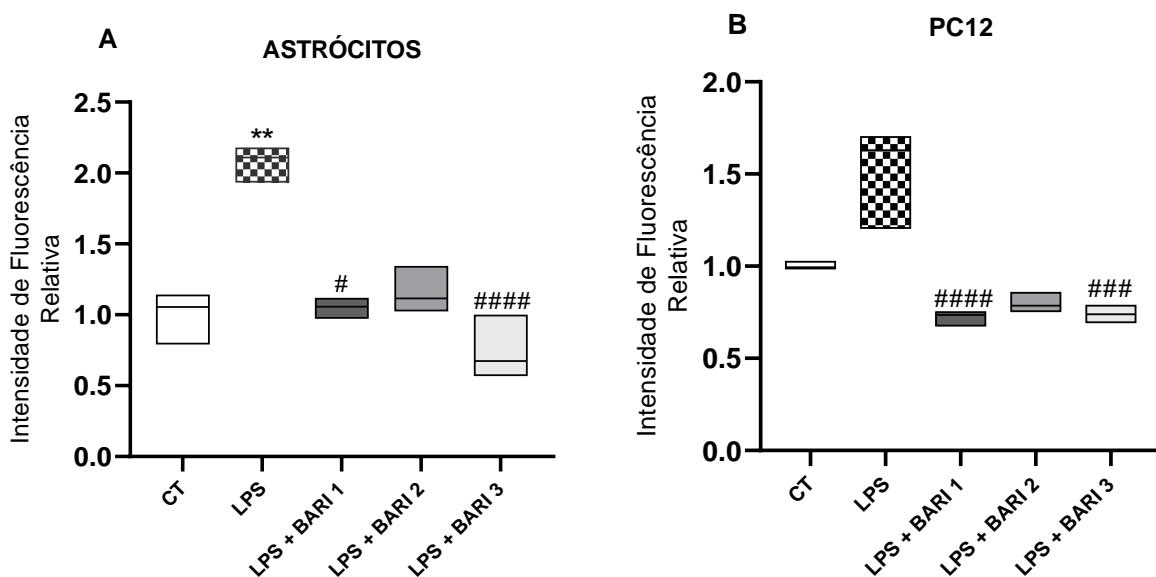
5.0.4 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Para analisar a atividade antioxidante do baricitinibe em células astrócitos e PC12, foi realizada uma análise de citometria baseada na marcação com DCF, que permite medir a fluorescência gerada pela oxidação do DCF pelas espécies reativas de oxigênio (EROs).

Nos astrócitos, observou-se que as células submetidas ao LPS apresentaram um aumento significativo na fluorescência, indicando uma maior produção de EROs. Em contrapartida, os grupos tratados com baricitinibe demonstraram uma atividade antioxidante eficaz, reduzindo significativamente os níveis de fluorescência CT: 1,06 (0,91 – 1,11); LPS: 2,11 (1,98-2,16); LPS + BARI 1 1,06 (1,03- 1,09); LPS + BARI 2: 1,11 (1,04 – 1,32); LPS + BARI 3: 0,67 (0,59 – 0,98) (Figura 22 A).

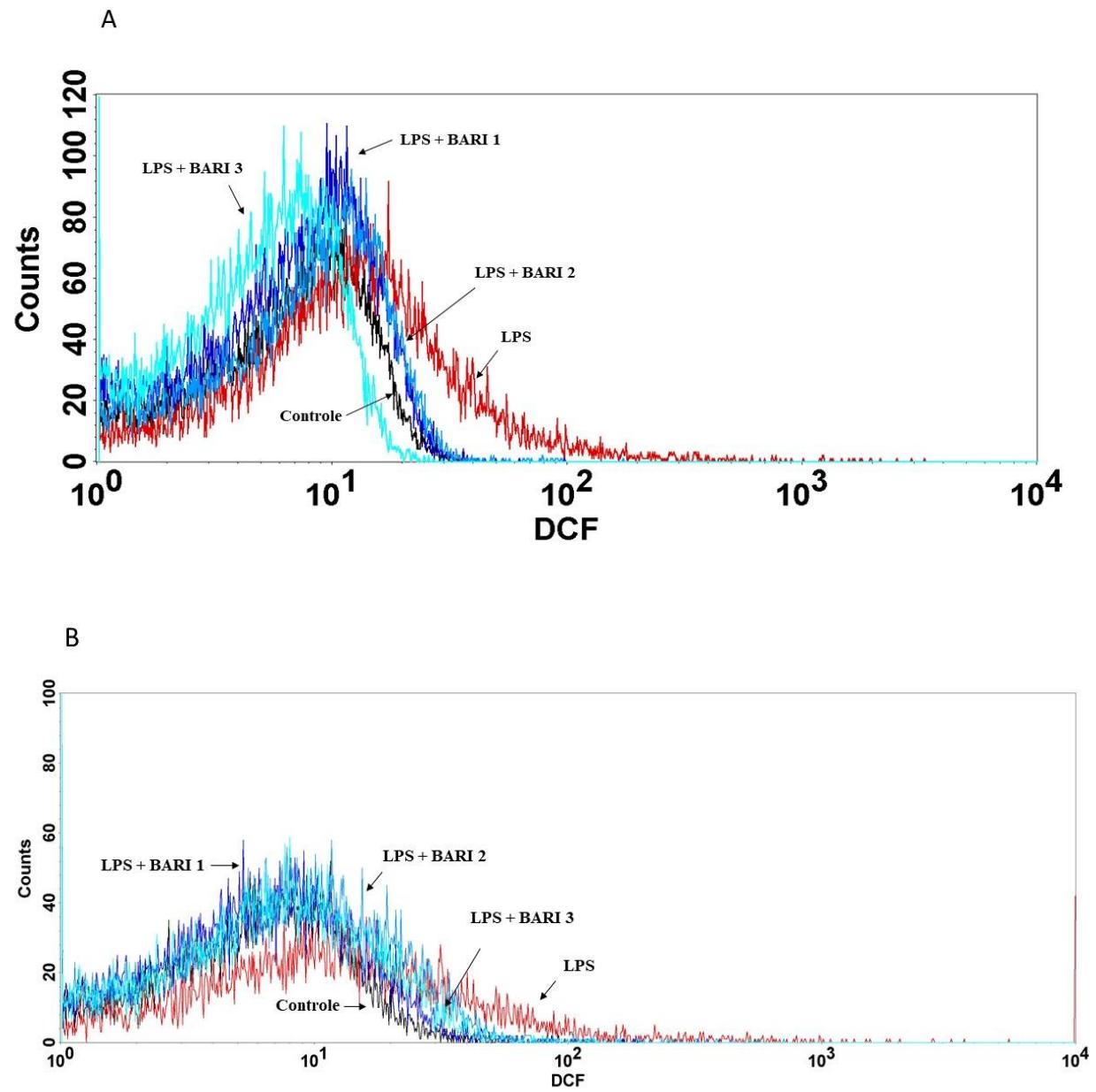
De forma semelhante, nas células PC12, as células submetidas ao LPS não houve aumento na fluorescência em relação ao grupo controle. No entanto, os grupos tratados com baricitinibe mostraram uma redução significativa dessa fluorescência quando comparados ao grupo LPS, comprovando a atividade antioxidante do baricitinibe com significância estatística CT: 0,99 (0,99 – 1,01); LPS: 1,63 (1,33-1,69); LPS + BARI 1 0,73 (0,69- 0,74); LPS + BARI 2: 0,78 (0,76 – 0,85); LPS + BARI 3 0,74 (0,70 – 0,77) (Figura 22 B).

Figura 22: Análise da atividade antioxidante do baricitinibe através da marcação de DCF



Os valores estão representados como mediana (Percentil25-percentil 75). **p<0,05 vs CT; #p<0,05; #####p<0,05vs LPS; #####p<0,05; ##p<0,05 vs LPS. Teste de Kruskall Wallis, seguido de Dunn's (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacárido, BARI 1: Baricitinibe 1,25µM, Baricitinibe 2: 0,63 µM; Baricitinibe 3: 0,31 µM

Figura 23: Histograma representativo do ensaio de DCFH-DA demonstrando a produção de espécies reativas de oxigênio em células astrócitos (A) e PC12 (B)



Nos gráficos A e B estão apresentados o grupo controle em preto, LPS em vermelho e o grupo tratado com baricitinibe nas tonalidades de azul, sendo o mais escuro BARI 1 ($1,25 \mu\text{M}$), azul mais claro BARI 3 ($0,31 \mu\text{M}$). Os picos representam a contagem de eventos (células) e suas respectivas fluorescências.

5.0.5 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias

Para avaliar a atividade anti-inflamatória do BARI, foram mensurados os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante das culturas celulares utilizando o teste de ELISA.

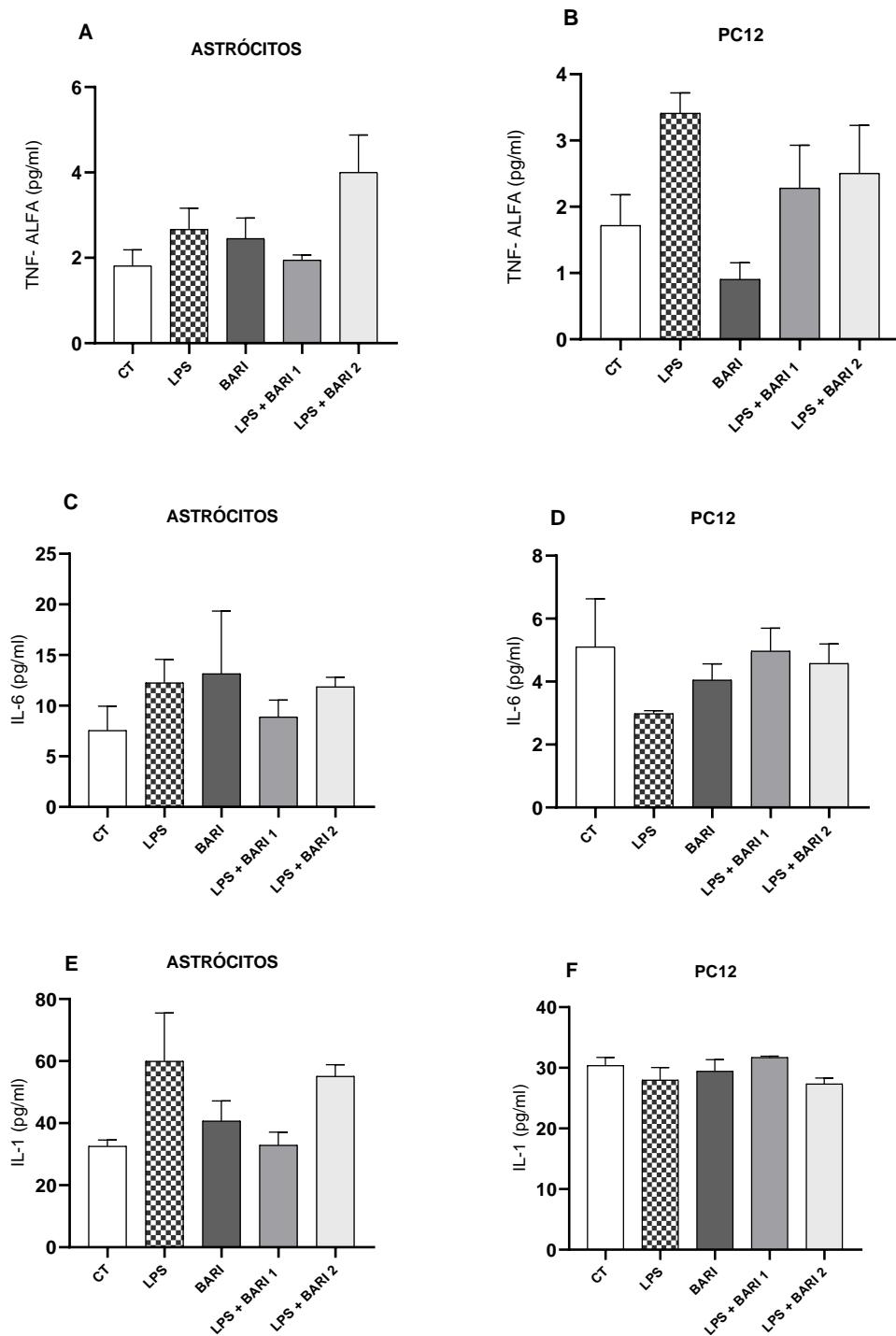
Nos astrócitos, observou-se que o tratamento com LPS, acarretou um aumento nos níveis de TNF- α em 47,51% em comparação ao controle. O tratamento com BARI na concentração B1 mostrou uma redução de 12,98%, enquanto na concentração B2 não houve reversão (CT: 1,81±0,37; LPS: 2,67±0,49; BARI: 2,45±0,47; LPS+BARI 1: 1,95±0,12; LPS+BARI 2: 4,00±0,87) (Figura 24A). Já nas células PC12, o LPS provocou um aumento expressivo de TNF- α , de 98,25% em relação ao controle, evidenciando o efeito inflamatório do LPS. Nos tratamentos com BARI, observou-se redução de TNF- α de 31,55% na concentração B1 e de 26,22% na concentração B2 (CT: 1,72 ± 0,46; LPS: 3,41 ± 0,31; LPS+BARI: 0,90 ± 0,25; LPS+BARI 1: 2,28±0,64; LPS+BARI 2: 2,50 ± 0,72) (Figura 24 B).

Na análise da citocina IL-6 em astrócitos, observou-se que a exposição ao LPS apresentou um aumento de 62,25% nos níveis dessa citocina em comparação ao controle. O tratamento com BARI na concentração BARI 1 foi capaz de reverter esse aumento em 17,13%, demonstrando uma redução significativa, enquanto a concentração B2 não apresentou efeito relevante (CT: 7,55 ± 2,40; LPS: 12,25 ± 2,31; BARI: 13,16 ± 6,19; LPS + BARI 1: 8,78 ± 1,67; LPS + BARI 2: 11,86 ± 0,94) (Figura 24 C). Por outro lado, nas células PC12, o LPS não induziu o aumento de IL-6 esperado, apresentando uma redução inesperada nos níveis da citocina. Além disso, os tratamentos com BARI, tanto nas concentrações BARI 1 quanto BARI 2, não mostraram alterações significativas nos níveis de IL-6 (CT: 5,10 ± 1,53; LPS: 2,98 ± 0,092; BARI: 4,05 ± 0,51; LPS + BARI 1: 4,97 ± 0,72; LPS + BARI 2: 4,57 ± 0,62) (Figura 24 D).

Na avaliação da citocina IL-1 β em astrócitos, a exposição ao LPS apresentou um aumento de 84,21% em relação ao controle, enquanto o tratamento com BARI na concentração B1 mostrou uma redução de 53,80% nos níveis de IL-1 β , indicando uma atividade anti-inflamatória robusta. Já a concentração B2 não apresentou reversão significativa (CT: 32,55 ± 2,05; LPS: 59,96 ± 15,54; BARI: 40,73 ± 6,46; LPS + BARI 1: 32,89 ± 4,17; LPS + BARI 2: 55,10 ± 3,71) (Figura 24 E). Nas células PC12, os níveis de IL-1 β não apresentaram alterações significativas em nenhuma das condições analisadas (CT: 30,38 ± 1,35; LPS: 27,97 ± 2,09; BARI: 29,45 ± 1,89; LPS + BARI 1: 31,71 ± 0,19; LPS + BARI 2: 27,36 ± 0,95) (Figura 24 F).

Esses resultados destacam a atividade anti-inflamatória do BARI na concentração 1 em astrócitos, especialmente na reversão dos efeitos do LPS, enquanto nas células PC12 os efeitos inflamatórios induzidos pelo LPS e as respostas ao tratamento com baricitinibe foram menos evidentes.

Figura 24: Avaliação da atividade na redução de citocinas com os grupo tratados com o BARI por meio da quantificação de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1) no sobrenadante de culturas de astrócitos e células PC12.



Os resultados são mostrados como média \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle negativo; LPS: Lipopolissacárido; BARI: Baricitinibe 1: 1,25 μ M, Baricitinibe 2 : 0,63 μ M; Baricitinibe 3: 0,31 μ M.

6.0 Resultados *In vivo*

6.0.1 Teste Campo Aberto

O teste de campo aberto é utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais, por meio de parâmetros como distância percorrida. Além disso, é empregado para analisar o comportamento ansioso, observando o tempo gasto na zona central.

8.0.1.1 Distância Percorrida

No protocolo 1, foi analisada a distância percorrida pelos animais como medida da atividade exploratória. Observou-se que o grupo tratado com LPS apresentou uma redução na distância percorrida, indicando menor exploração do aparato quando comparado ao grupo controle. Os grupos não apresentaram resultados significativos, porém podemos ver uma diminuição da distância percorrida do grupo LPS em comparação aos grupos controles (CT: $54,33 \pm 5,78$; SAL + BARI: $53,36 \pm 4,98$; SAL + FLU: $54,52 \pm 4,59$; LPS 0,5mg/kg: $31,26 \pm 1,64$; LPS 0,5mg/kg + BARI : $37,42 \pm 5,32$; LPS 0,5mg/kg + FLU: $32,89 \pm 6,19$) (Figura 25 A). Já no protocolo 2, foi administrado LPS nas doses 0,5mg ou 1mg, e o controle positivo foi substituído pelo ESC para avaliação mais detalhada do comportamento exploratório, observou-se que o LPS, nas doses de 0,5 mg e 1 mg, causou leve redução na distância percorrida (CT: $8,41 \pm 0,79$; LPS 0,5 mg/kg: $7,59 \pm 1,08$; LPS 1 mg/kg: $7,52 \pm 0,94$; LPS 0,5 mg/kg + BARI: $5,83 \pm 0,43$; LPS 1 mg/kg + BARI: $7,93 \pm 0,57$; LPS 0,5 mg/kg + ESC: $8,29 \pm 0,52$) (Figura 25 B). Entre os grupos tratados, a maioria manteve valores semelhantes ao controle, exceto o grupo BARI + LPS 0,5 mg, que apresentou discreta diminuição na distância percorrida.

No protocolo 3, a distância percorrida foi novamente analisada, mas não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (CT: $10,63 \pm 1,01$; LPS 0,5mg/kg: $10,11 \pm 0,66$; LPS 0,5mg/kg + BARI: $7,62 \pm 0,84$; LPS 0,5mg/kg + ESC: $8,60 \pm 0,54$) (Figura 25 C). Esses resultados sugerem que, nesse período, nem o LPS nem os tratamentos testados afetaram de maneira significativa a atividade exploratória dos animais.

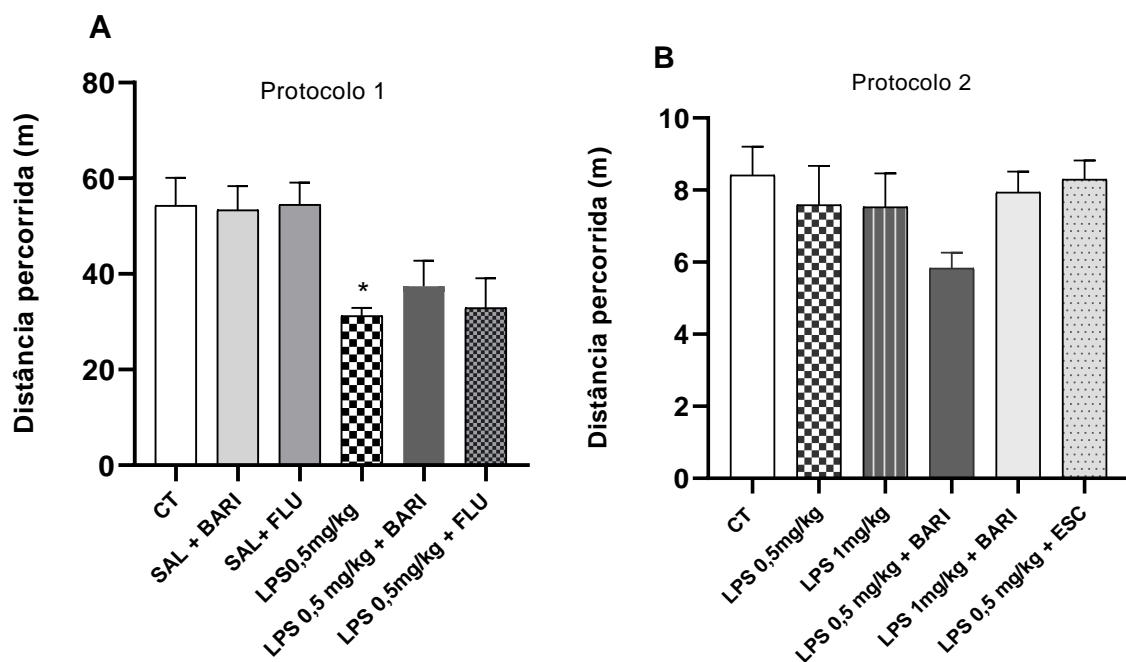
8.0.1.2 Tempo na Zona Central

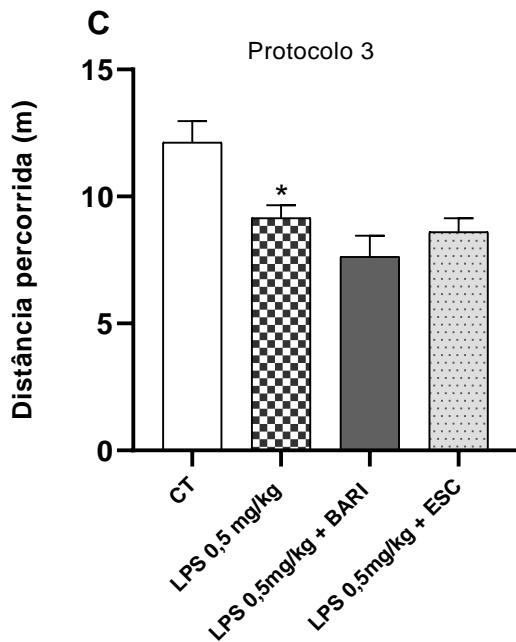
O parâmetro de tempo na zona central foi avaliado como um indicativo do nível de ansiedade dos animais, considerando que animais ansiosos tendem a permanecer predominantemente na periferia do aparato. No protocolo 1, foi analisado o efeito do LPS e do tratamento com BARI ou FLU. Os resultados não demonstraram resultados significativos (Controle: $29,89 \pm 4,08$; SAL + BARI: $29,14 \pm 5,16$; SAL+ FLU: $33,83 \pm 5,04$; LPS 0,5 mg: $17,33 \pm 1,73$; LPS 0,5mg/kg + BARI : $20,05 \pm 3,46$; LPS 0,5mg/kg + FLU: $21,78 \pm 5,23$) (Figura 25A). Já no

protocolo 2, o LPS foi administrado nas doses de 0,5 mg/kg ou 1 mg/kg, sendo o controle positivo substituído pelo ESC, permitindo uma avaliação mais detalhada do comportamento exploratório. Observou-se que o grupo LPS 1 mg/kg apresentou uma diminuição significativa no tempo na zona central em comparação ao grupo controle, enquanto o grupo LPS 0,5 mg/kg não demonstrou alterações relevantes. No entanto, o tratamento com BARI em associação ao LPS resultou em uma diminuição adicional no tempo na zona central (CT: $22,84 \pm 5,58$; LPS 0,5 mg/kg: $28,93 \pm 4,98$; LPS 1 mg/kg: $8,82 \pm 1,90$; LPS 0,5 mg/kg + BARI: $9,74 \pm 1,54$; LPS 1 mg/kg + BARI: $21,46 \pm 5,05$; LPS 0,5 mg/kg + ESC: $14,46 \pm 2,74$) (Figura 25 B).

No protocolo 3 observou-se que apesar de não terem sido estatisticamente significativos, houve uma redução no tempo de permanência na zona central nos animais que receberam apenas LPS, em comparação ao grupo controle. O tratamento com BARI não foi capaz de reverter o efeito do LPS, enquanto o ESC mostrou um aumento no tempo na zona central em relação ao LPS, embora essa diferença também não tenha sido estatisticamente significativa (CT: 28,50 (18,45-70,40); LPS 0,5mg/kg: 19,10 (13,05-23,75); LPS 0,5mg/kg + BARI: 9,95 (8,95 -24,43); LPS 0,5mg/kg + ESC: 24,10 (10,65- 49,10) (Figura 25 C).

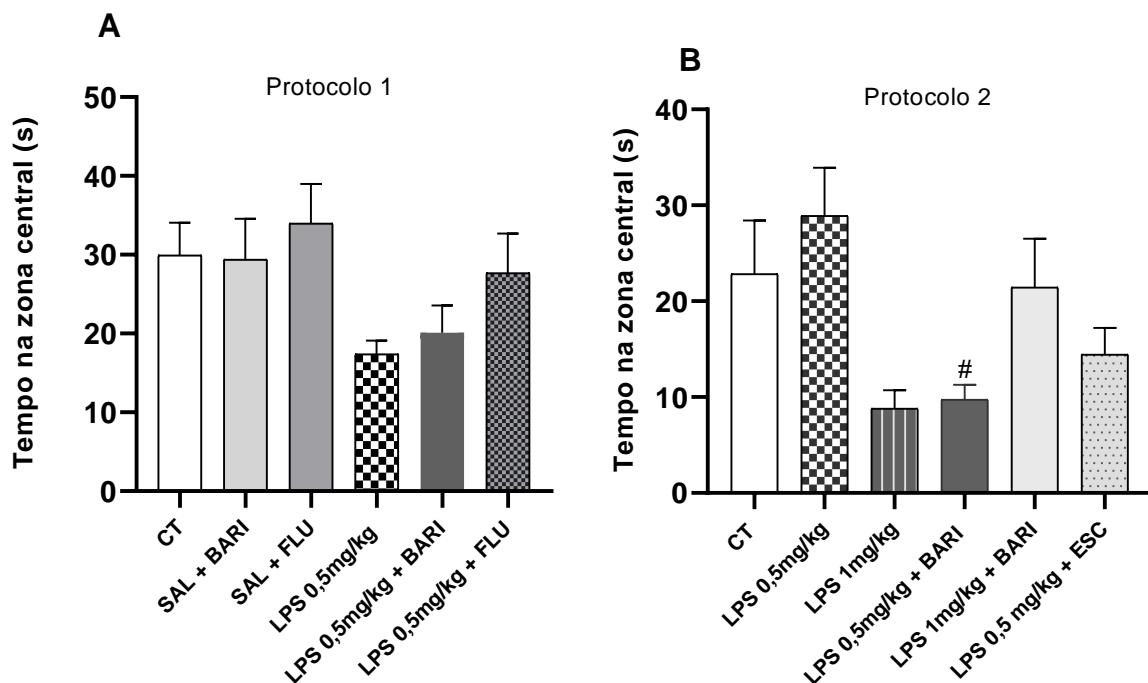
Figura 25: Efeito do baricitinibe na atividade locomotora e exploratória foi avaliado pela distância percorrida no teste campo aberto, em protocolos de 5 e 10 dias.

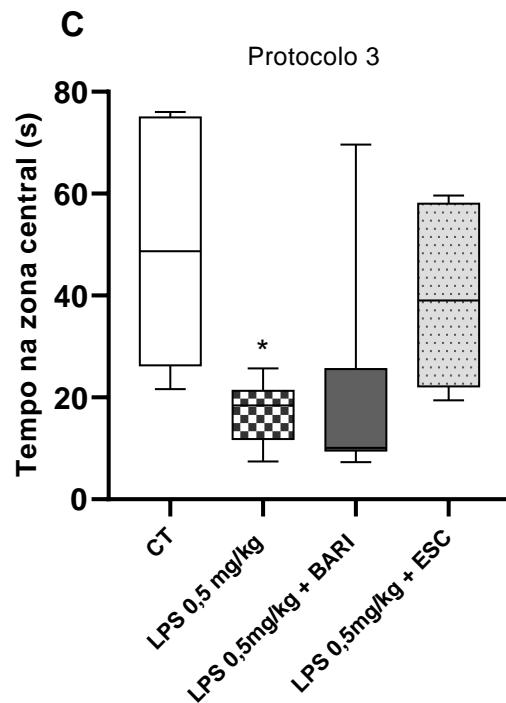




Os resultados são mostrados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs CT; $p < 0,05$ vs CT. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Sindak's. CT: Controle negativo; LPS: Lipopolissacarídeo; SAL:Salina; BARI: Baricitinibe, FLU: Fluxetina; ESC: Escitalopram.

Figura 26: Efeito do baricitinibe na atividade ansiolítica, pelo tempo na zona central do campo aberto, em protocolos de 5 e 10 dias.



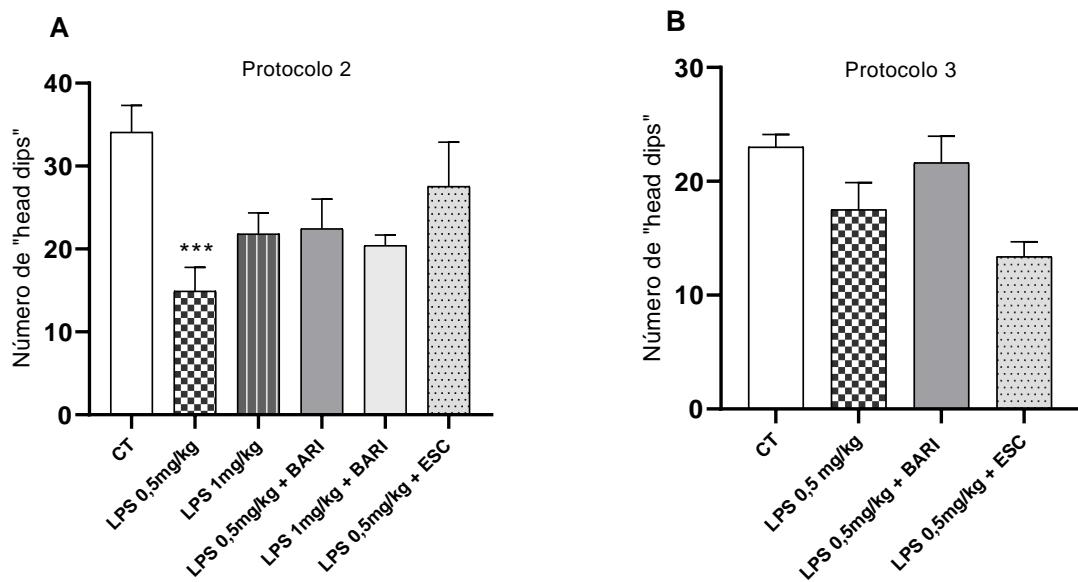


Nos gráficos A e B os resultados são representados como média \pm EPM. ${}^{\#}p < 0,05$ vs LPS 0,5mg; $*p < 0,05$ vs CT. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste Sindak's. O gráfico C Os valores estão representados como mediana (Percentil25-percentil 75). Teste de Kruskall Wallis, seguido de Dunn's (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BARI: baricitinibe ESC: Escitalopram.

6.0.2 Teste Placa Perfurada

O teste da placa perfurada foi utilizado para avaliar o comportamento ansioso dos animais. No protocolo 2, observou-se os seguintes resultados para o número de "*head dips*" (CT: $34,09 \pm 3,24$; LPS 0,5mg/kg: $14,91 \pm 2,87$; LPS 1mg/kg: $21,82 \pm 2,52$; LPS 0,5mg/kg + BARI: $22,45 \pm 3,57$; LPS 1mg/kg + BARI: $20,40 \pm 1,29$; LPS 0,5mg/kg + ESC: $27,55 \pm 5,32$) (Figura 27 A). Esses dados indicam uma redução significativa nos "*head dips*" no grupo tratado com LPS 0,5 mg e há uma diminuição também no tratamento com LPS 1 mg/kg em comparação ao grupo controle, sugerindo que o LPS foi capaz de induzir um comportamento ansioso, já no grupo tratado houve um aumento da exploração do animal em comparação ao LPS. No protocolo 3, resultados demonstraram que, ao comparar o grupo controle com o grupo LPS, houve uma redução no número de "*head dips*" no grupo LPS (CT: $23,00 \pm 1,11$; LPS 0,5mg/kg: $17,50 \pm 2,39$). Isso indica que os animais do grupo LPS apresentaram maior comportamento ansioso, evidenciado por uma menor exploração em comparação ao grupo controle, já nos grupos tratados com BARI e ESC, os resultados mostraram que os tratamentos não foram capazes de reverter o comportamento ansioso induzido pelo LPS, conforme resultados (LPS 0,5mg/kg +BARI: $21,63 \pm 2,33$; LPS 0,5mg/kg + ESC: $13,38 \pm 1,32$). (Figura 27 B)

Figura 26: Efeito do tratamento do baricitinibe 10mg/kg no teste placa perfurada, avaliação do comportamento ansioso no protocolo de 5 e 10 dias.



Os animais (n=6-8animais/grupo), receberam durante 5 dias LPS 0,5 mg/kg ou 1mgkg por via intraperitoneal e concomitantemente receberam os tratamentos por via oral como ESC 10mg/kg e BARI 10mg/kg. Os valores estão representados como média ± EPM. *** p<0,01vs. Teste *One-way ANOVA*, seguido pós teste de Sidak's CT: Controle; SAL: Salina; LPS: Lipopolisacarídeo; BARI: Baricitinibe; ESC: Escitalopram.

6.0.3 Teste Nado Forçado

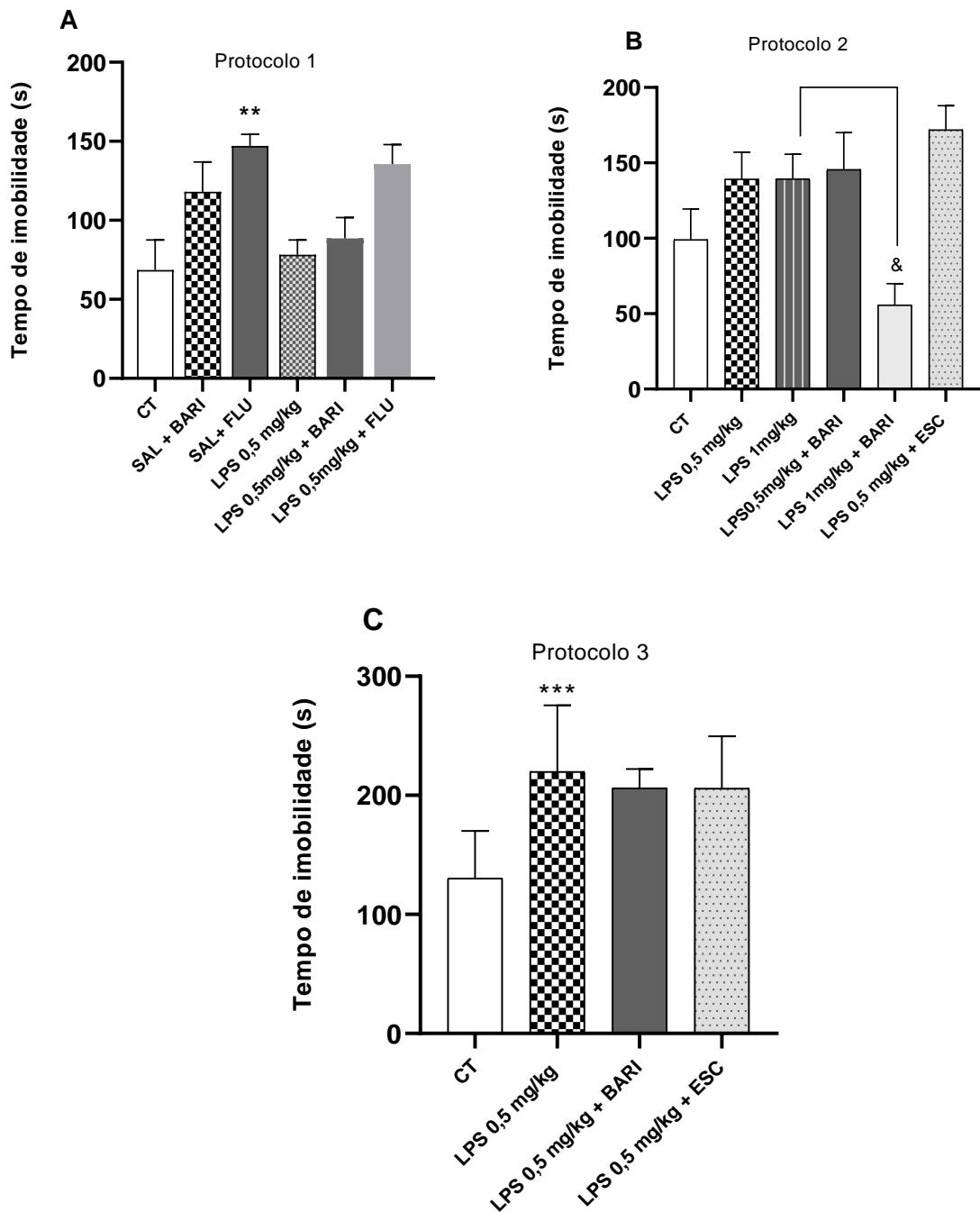
No teste nado forçado, o tempo de imobilidade é o principal parâmetro analisado, sendo que períodos mais longos de imobilidade podem indicar comportamento depressivo.

No protocolo 1, foi observado que o LPS 0,5mg/kg não causou um aumento significativo no tempo de imobilidade, enquanto o grupo LPS 0,5mg/kg + FLU apresentou maior tempo de imobilidade em comparação ao grupo LPS 0,5mg/kg isolado. Esses dados sugerem que o LPS 0,5mg/kg, em si, não foi suficiente para induzir comportamento depressivo significativo, após os 5 dias de administração. A FLU não demonstrou seu efeito terapêutico esperado neste protocolo e que o BARI não mostrou resultado antidepressivo nesse protocolo (CT: $68,50 \pm 19,08$; SAL + BARI: $118,10 \pm 18,87$; SAL + FLU: $147,10 \pm 7,25$; LPS 0,5mg/kg: $78,30 \pm 9,36$; LPS 0,5mg/kg + BARI: $88,60 \pm 13,08$; LPS + FLU: $135,60 \pm 12,34$) (Figura 28 A).

Posteriormente, foi realizado o protocolo 2 utilizando LPS nas doses de 0,5 mg e 1 mg, além do controle positivo com ESC. Os resultados obtidos foram: (CT: $99,06 \pm 20,42$; LPS 0,5mg/kg: $139,3 \pm 17,68$; LPS 1mg/kg: $139,5 \pm 16,20$; LPS 0,5mg/kg + BARI: $145,5 \pm 24,61$, LPS 1mg/kg+ BARI: $55,82 \pm 14,11$; LPS 0,5mg/kg + FLU: $171,8 \pm 16,05$) (Figura 28 B), os dados indicam que o LPS, em ambas as doses, aumentou o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Observamos uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no grupo BARI + LPS 1 mg/kg em comparação ao grupo LPS 1 mg/kg, sugerindo um efeito de reversão do dano induzido pelo LPS na dose mais alta. Por outro lado, o grupo LPS 0,5 mg/kg+ ESC não apresentou diferenças significativas, indicando ausência de efeito protetor relevante do ESC nessa condição.

No protocolo 3 obtivemos como resultados (CT: $130,5 \pm 12,52$; LPS 0,5mg/kg: $207,8 \pm 20,53$) o LPS 0,5mg/kg foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade do animal, em comparação ao grupo controle, sendo capaz causar um comportamento depressivo-símile. Nos grupos tratados (LPS 0,5mg/kg + BARI: $175,8 \pm 20,70$; LPS 0,5mg/kg + ESC: $206,0 \pm 13,83$) não foram capazes de reverter o dano causado pelo LPS.

Figura 28: Efeito do tratamento do baricitinibe 10mg/kg no teste nado forçado no protocolo de 5 dias de LPS.

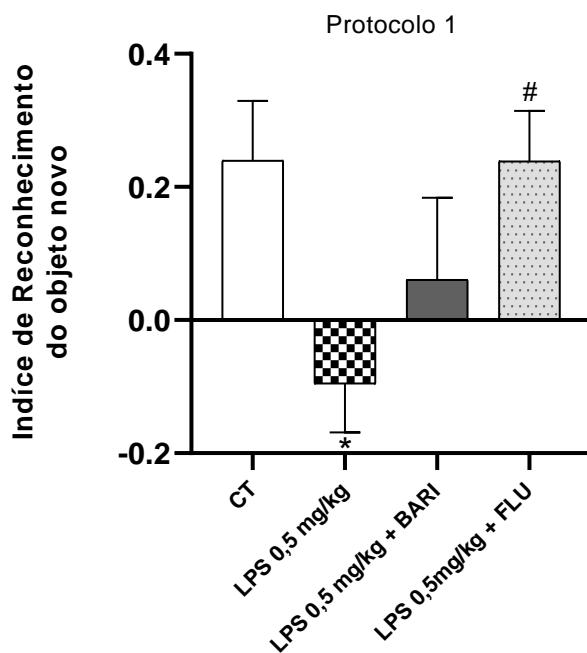


Os animais (n= 6-8 animais/grupo), receberam 5 dias LPS 0,5 mg/kg ou LPS 1mg/kg por via intraperitoneal e concomitante os tratamentos por via oral FLU 10mg/kg ou ESC 10mg/kg ou BARI 10mg/kg . Os valores estão representados como média ± EPM. *p<0,01vs LPS; &p<0,01vs LPS 1mg ; ***p<0,01 vs CT . Teste One-way ANOVA, seguido pós teste Sidak's. CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, SAL:Salina; BARI: Baricitinibe, FLU: Fluoxetina, ESC: Escitalopram.

6.0.4 Reconhecimento do Objeto Novo

O teste de reconhecimento de objetos avalia a memória de curto e longo prazo. Neste trabalho, analisamos a memória de curto prazo em um protocolo de 5 dias de administração de LPS, associado aos tratamentos com BARI e FLU (CT: $0,24 \pm 0,09$; LPS 0,5mg/kg: $-0,09 \pm 0,07$; LPS 0,5mg/kg+ BARI: $0,06 \pm 0,12$; LPS 0,5mg/kg +FLU: $0,23 \pm 0,07$). Observou-se que o LPS apresentou uma redução no índice de reconhecimento de objetos em contrapartida, os grupos tratados com baricitinibe e fluoxetina mostraram aumento desse índice em comparação com o grupo tratado apenas com LPS 0,5mg/kg (Figura 29).

Figura 29: Efeito do baricitinibe na memória curto prazo mensurado no teste reconhecimento de objetos.



Os animais ($n=8/10$ animais/grupo), receberam durante 5 dias LPS 0,5 mg/kg por via intraperitoneal e concomitantemente receberam os tratamentos por via oral como FLU 10mg/kg e BARI 10mg/kg. Os valores estão representados como média \pm EPM. * $p<0,01$ vs CT; # $p<0,01$ vs LPS 0,5mg. Teste One-way ANOVA , seguido pós teste de Sidak's. CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BARI: Baricitinibe, FLU: Fluoxetina.

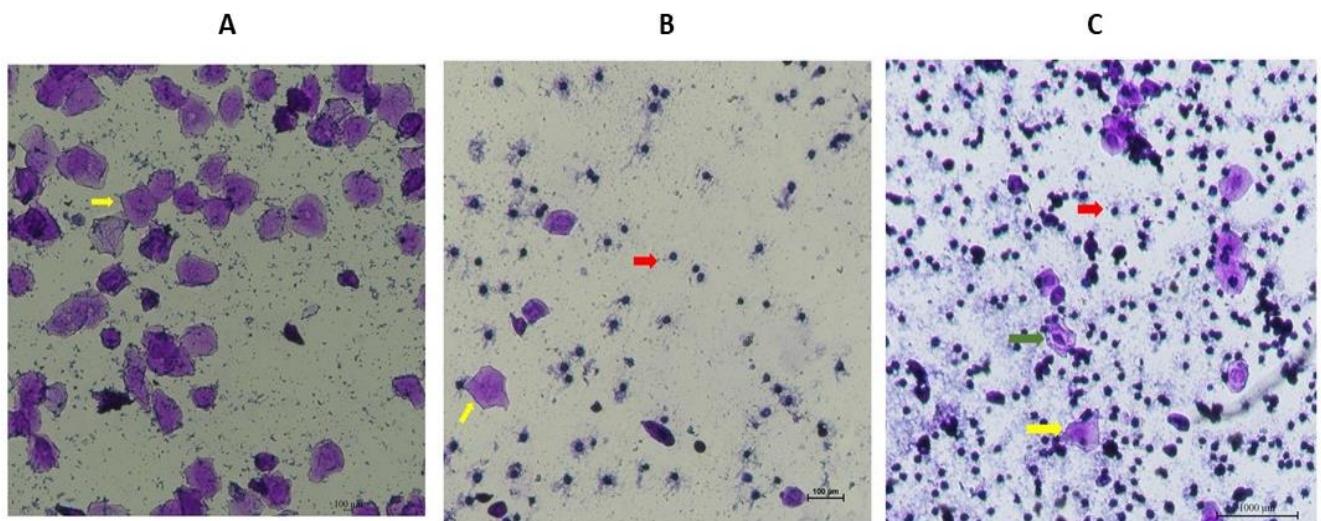
6.0.5 Ciclo Estral

Para a análise do ciclo estral, realizou-se o lavado vaginal após a observação dos comportamentos dos animais. Observou-se que eles estavam predominantemente nas fases de estro e metaestro, em processo de transição. Protocolo 1: A maioria dos animais encontrava-se na fase de estro; Protocolo 2: Os animais estavam em metaestro e diestro, sugerindo uma fase de transição; Protocolo 3: A maioria estava em estro, enquanto alguns apresentavam-se em metaestro, também indicando um estágio de transição.

Na fase de estro, nota-se a predominância de células epiteliais cornificadas, que são irregulares, anucleadas e resultantes do processo de queratinização associado à maturação celular e à exposição ao estrogênio (Figura 30 A).

Na fase de metaestro, observa-se uma mistura de células epiteliais cornificadas e leucócitos (Figura 30 B), enquanto na fase de diestro há a presença de células cornificadas, células epiteliais nucleadas e um número significativo de leucócitos (Figura 30 C). Além disso, nas fases de metaestro e diestro, há presença de estrogênio e aumento de progesterona.

Figura 30: Esfregaço vaginal representando as diferentes fases do ciclo estral dos camundongos.



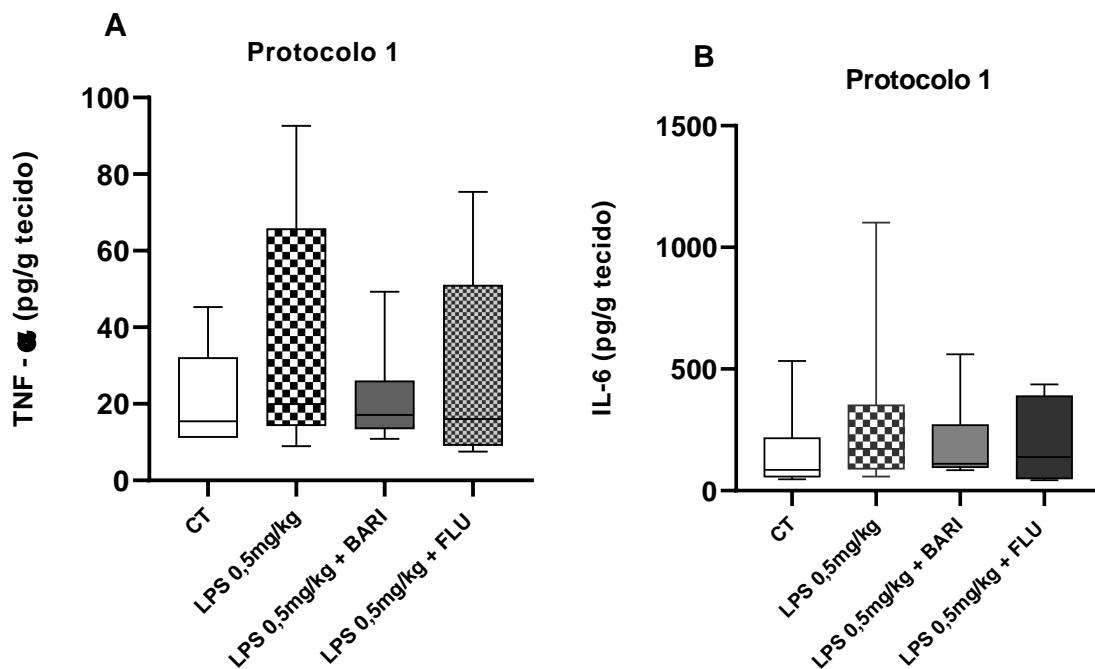
A figura (A) ilustra o estágio de estro, enquanto a figura (B) representa o metaestro e a figura (C) diestro. Cada fase do ciclo é identificada por meio de citologia vaginal, com base nas células presentes no esfregaço vaginal. Nas imagens, observam-se células epiteliais cornificadas (indicadas pela seta amarela), leucócitos (indicados pela seta vermelha), células epiteliais nucleadas (indicadas pela seta verde).

6.0.6 Teste Neuroquímico

8.0.6.1 Dosagem de Citocinas

A análise das dosagens de citocinas no hipocampo dos níveis de TNF- α e IL-6 no grupo LPS em comparação ao grupo controle e aos grupos tratados. Observou-se que não houve redução dessas citocinas, nos grupos tratados com baricitinibe e fluoxetina TNF - α , CT: 20,45 (11,33-32,07); LPS 0,5mg/kg 36,76 (14,41-65,45); LPS 0,5mg/kg + BARI: 21,17 (13,51 - 26,00); LPS 0,5mg/kg + FLU: 27,26 (9,19-50,95) (Figura 31 A) e a citocina IL-6, CT: 154,0 (56,61-217,00); LPS 0,5 mg/kg: 296,00 (89,00 -352,00); LPS 0,5mg/kg + BARI 1: 192,70 (95,35 - 270,50) ; LPS 0,5mg/ kg + FLU: 189,80 (49,03 -389,40) (Figura 31 B).

Figura 31: Análise da atividade antiinflamatória do baricitinibe por meio da quantificação de citocinas (TNF- α , IL-6) no hipocampo em animais submetidos a exposição de LPS.



Nos gráficos A e B os valores estão representados como mediana (Percentil25-percentil 75). Teste de Kruskall Wallis, seguido de Dunn's (*post hoc*). CT: Controle, LPS: Lipopolissacarídeo, BARI: baricitinibe FLU: Fluoxetina.

7.0 DISCUSSÃO

Os transtornos mentais têm se tornado uma questão de grande preocupação global, considerando o aumento expressivo no número de pessoas afetadas. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 450 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de transtornos psiquiátricos. Entre os mais prevalentes destacam-se os transtornos de ansiedade, depressão e déficits cognitivos (Rocha; Hara, Paprocki, 2015).

Nesse contexto, de crise mundial em saúde mental, este trabalho teve como objetivo explorar o potencial do BARI, um medicamento amplamente utilizado no manejo da artrite reumatoide e dermatite atópica.

Assim, buscou-se compreender qual o efeito do baricitinibe nas células do SNC, como os astrócitos e células PC12. Os astrócitos são células da glia, que desempenham papéis fundamentais, como regulamentação do metabolismo do glutamato, defesas antioxidantes e respostas inflamatórias/ imunes. As células PC12 são amplamente estudadas, pois exibem características semelhantes a neurônios e auxiliam na compreensão das doenças neurológicas, incluindo sobrevida neuronal, proliferação e diferenciação (Zaho et al., 2023).

Neste estudo, investigada a atividade do baricitinibe (BARI) em células PC12 e astrócitos por meio de diferentes abordagens experimentais. Inicialmente, realizou-se o teste de redução de MTT para avaliar a citotoxicidade da substância. Os resultados mostraram que apenas na concentração de 5 µM foi tóxica para astrócitos, enquanto nas células PC12 não houve evidências de toxicidade. Estudo anterior em monócitos também indicaram a ausência de toxicidade significativa dentro da faixa de concentrações testadas (0,001 µM a 10 µM), reforçando a segurança do baricitinibe (Gavegno et al., 2019).

Nesse contexto, ao chegarmos na compreensão da faixa de concentração viável para as células, buscamos compreender a atividade do baricitinibe na proteção de células PC12 e astrócitos contra os danos induzidos por LPS, que é conhecido por desencadear inflamação podendo gerar morte celular por apoptose ou necrose. Utilizamos a marcação com anexina V e 7-AAD para avaliar as respostas celulares, sendo a anexina V indicativa de apoptose e o 7-AAD de necrose (Zimmermann; Meyer, 2011). A dupla marcação permite avaliar células apoptóticas tardias e necróticas, gerando morte celular.

Nas células de astrócitos, observou-se que a exposição ao LPS resultou em um aumento significativo das células marcadas por anexina V e 7-AAD, indicando que o LPS foi capaz de induzir tanto apoptose quanto necrose, o que está de acordo com achados previamente reportados na literatura (Rebouças, 2024). No entanto, quando as células foram tratadas com baricitinibe, observou-se uma redução significativa na apoptose e necrose, sugerindo que o

baricitinibe foi capaz de proteger essas células contra os danos induzidos pelo LPS. Isso pode ser explicado pela capacidade do baricitinibe de inibir a via JAK/STAT, especialmente a ativação de STAT3, que está fortemente envolvida na transdução de sinais pró-inflamatórios e antiapoptóticos. A inibição dessa via pode modular negativamente a expressão de citocinas inflamatórias e de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) aumentando, assim, a susceptibilidade das células à apoptose e promovendo a proteção contra necrose assim visto nas células PC12 (Duan et al., 2013).

Ao comparar os resultados em células PC12, que são mais sensíveis a estímulos neurotóxicos, notamos que o LPS induziu um aumento nas células marcadas por 7-AAD, evidenciando necrose, mas não foi observada uma significativa indução de apoptose, o que pode sugerir que as células PC12 apresentam uma resposta diferente das células de astrócitos quando expostas ao LPS. Este fenômeno pode ser atribuído à natureza diferente dessas células, enquanto os astrócitos desempenham um papel ativo na resposta imunológica e inflamatória, as células PC12, embora também neurotróficas, são menos suscetíveis à indução de apoptose quando comparadas aos astrócitos, que são células de defesa do sistema nervoso central (Ng & Ma, 2019).

A proteção conferida pelo baricitinibe foi observada de maneira mais pronunciada nas células astrócitos, onde tanto a apoptose quanto a necrose foram mitigadas, e nas células PC12, onde a proteção foi mais evidente contra a necrose. Como discutido por Duan et al., (2013) a ativação de STAT3, mediada por JAKs, é crítica para a expressão de genes que regulam a sobrevivência celular, incluindo proteínas antiapoptóticas. No entanto, a inibição dessa via pode, paradoxalmente, não apenas aumentar a sensibilidade das células à apoptose em algumas condições, mas também reduzir a inflamação e estresse oxidativo, proporcionando uma proteção contra necrose.

Portanto, os dados obtidos neste estudo corroboram a literatura existente ao demonstrar que o baricitinibe, ao inibir a via JAK/STAT, modula a resposta inflamatória e a morte celular, proporcionando proteção contra necrose e, em menor grau, contra apoptose, dependendo do tipo celular e do contexto do estímulo. Essa diferenciação na resposta ao LPS pode estar relacionada ao papel específico das células PC12 e astrócitos na modulação da inflamação e do estresse celular (Zhang, 2018). Assim, o baricitinibe se apresenta como um possível agente terapêutico para proteger as células neurais e gliais contra danos induzidos por inflamação, com implicações em doenças neurodegenerativas e outras condições inflamatórias do sistema nervoso.

No contexto da morte celular, diversos fatores favorecem o processo apoptótico,

incluindo a ativação de sinalizações pró-inflamatórias, a geração excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), a falha na homeostase redox e a produção de mediadores inflamatórios. As ERO desempenham papéis importantes na sinalização celular e na defesa contra microrganismos invasores. Contudo, quando produzidas em excesso, levam a danos celulares, incluindo necrose. O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio, elevada concentração de lipídios (suscetíveis à peroxidação) e sistemas antioxidantes relativamente menos eficientes. Esses fatores tornam as ERO uma das principais causas de neurodegeneração, além de estarem envolvidas na patogênese do transtorno depressivo maior (Bhatt; Nagappa; Patil, 2020).

Neste estudo, buscou-se analisar se o baricitinibe tem uma atividade antioxidantas nas células PC12 e astrócitos através da marcação (DCFH-DA). Observou-se que o tratamento com LPS aumentou significativamente a fluorescência, indicando elevação na produção de ERO, corroborado com Rebouças (2024). No entanto, nos grupos tratados com baricitinibe, houve uma redução significativa na fluorescência, sugerindo uma atividade antioxidantante.

Nossos achados estão em concordância com os dados reportados por estudo de Wang et al., (2023), que demonstrou que a hiperativação da via JAK2/STAT3 suprime a expressão e a atividade da glutationa peroxidase (GPx3), uma enzima chave na neutralização de ERO em células renais. A redução da GPx3 contribui para o acúmulo de espécies reativas e o desequilíbrio redox. O baricitinibe, como um inibidor seletivo dessa via, interfere promovendo um equilíbrio redox e a redução de ERO. Esses resultados sugerem que a modulação do eixo JAK2/STAT3 pelo baricitinibe pode ser um mecanismo importante na atividade antioxidantante, com implicações relevantes na neuroproteção e na redução de processos inflamatórios.

Além disso, é fundamental destacar a importância das mitocôndrias, organelas intracelulares responsáveis pela produção de trifosfato de adenosina (ATP), a principal fonte de energia celular. O cérebro, como tecido de maior demanda energética, é especialmente sensível à disfunção mitocondrial. Quando ocorre essa disfunção, seja devido ao estresse oxidativo ou a fatores inflamatórios, há alterações significativas na cascata bioquímica celular. Dentre essas alterações, os danos à cadeia de transporte de elétrons têm sido apontados como um fator crucial na patogênese de diversos transtornos neuropsiquiátricos (Rezin et al., 2009).

Neste cenário, utilizou-se a marcação com Rhodamine 123 (Rho123), que permite identificar células viáveis por meio da fluorescência mitocondrial. Observou-se um aumento significativo da fluorescência nas células do grupo controle em comparação ao grupo tratado com LPS, indicando que o LPS causou disfunção mitocondrial. Nos grupos tratados com baricitinibe, especialmente nas células PC12, foi verificado uma atividade protetora

mitocondrial.

Os resultados indicam que o baricitinibe, por sua ação como inibidor seletivo de JAK1/JAK2, reduz a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em menor estresse oxidativo e consequente preservação das membranas mitocondriais. O acúmulo de ERO nas células pode causar danos às mitocôndrias, comprometendo sua função e levando à morte celular. Ao diminuir os níveis de ERO, o baricitinibe parece exercer um efeito protetor, mantendo a integridade mitocondrial e prevenindo o agravamento dos danos celulares (Crider; Pillai, 2017)

Atuando a nível intracelular, Bari modula a atividade de enzimas Janus, interrompendo a sinalização de diversos mecanismos, incluindo aqueles que são mediados por receptores de citocinas (Dowty et al., 2019).

Nesse contexto, foi avaliada a ação do BARI sobre níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, TNF- α e a IL-6 desempenham um papel crucial na regulação de processos neuroinflamatórios. Pesquisas recentes sugerem uma relação entre inflamação e alterações estruturais cerebrais, concluindo que a IL-1 β está associada a alterações mediadas por mecanismos inflamatórios e pode ser relevante na fisiopatologia de condições como esquizofrenia e outros transtornos mentais (Williams et al., 2022). Além disso, citocinas como o TNF- α e a IL-6, têm sido amplamente estudadas, pois estudos, como Lee e Giuliani (2019) revelaram que pacientes com depressão apresentam níveis significativamente elevados dessas citocinas. Sendo assim, este trabalho mensurou essas citocinas em células PC12 e astrócitos após a exposição de LPS e tratadas com o baricitinibe, visto a reversão dos danos causados pelo LPS, evidenciando assim atividade antiinflamatória do BARI, corroborando com a literatura de (McInnes et al., 2019).

Compreendida a atividade protetora do baricitinibe na apoptose e necrose celular, em virtude de suas propriedades antioxidantes e de proteção mitocondrial em células astrocíticas e PC12, o estudo avançou para os testes *in vivo*. Esses testes visaram avaliar o impacto do baricitinibe no sistema nervoso central (SNC), utilizando o teste de campo aberto, que avalia a atividade exploratória do animal e permite verificar se a substância estudada possui efeito estimulador ou depressor no SNC. Além disso, foi analisado o tempo de permanência na zona central do aparato, uma vez que animais com comportamento tipo ansioso que tendem a explorar mais as regiões periféricas (Chen et al., 2024).

O estudo buscou aprofundar a compreensão dos efeitos do baricitinibe no SNC, organizando-se em três linhas do tempo experimentais. No protocolo 1, foi utilizado um protocolo de cinco dias, no qual os animais receberam tratamentos orais com baricitinibe e

fluoxetina. Uma hora após a administração dos medicamentos, foi administrado lipopolissacarídeo (LPS) na dose de 0,5 mg/kg por via intraperitoneal. Os resultados indicaram que o LPS isoladamente reduziu a distância percorrida pelos animais no teste de campo aberto, evidenciando seu efeito depressor sobre o SNC. Além disso, o LPS diminuiu o tempo de permanência na zona central do aparato, o que sugere comportamento ansioso-símile.

Por outro lado, a fluoxetina não apresentou efeitos significativos, tanto estimulatórios quanto depressores, corroborando resultados prévios da literatura (Ali et al., 2020). De forma semelhante, o baricitinibe também não demonstrou efeitos estimulantes ou depressores no SNC. No que diz respeito à proteção promovida pelos tratamentos, nem o a fluoxetina e nem o baricitinibe resultaram em dados significativos nesta etapa.

No protocolo 2 foi adotado o mesmo protocolo experimental, mas com a inclusão de doses de LPS de 0,5 mg/kg e 1 mg/kg, além de um controle positivo utilizando escitalopram (10 mg/kg). No teste de campo aberto, a análise da distância percorrida mostrou que o LPS não induziu alterações significativas. Quando avaliado o tempo de permanência na zona central, observou-se que o LPS, em ambas as doses, também não causou danos comportamentais. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que os animais dessa linha experimental estavam nas fases de metaestro e diestro do ciclo estral, caracterizadas por níveis elevados de progesterona e presença de estrogênio, os quais exercem efeitos protetores, conforme relatado por Barbosa et al., 2019. Os grupos tratados com baricitinibe e escitalopram não apresentaram efeitos significativos nesses parâmetros comportamentais.

No protocolo 3, foi utilizado um protocolo de exposição ao LPS por 10 dias consecutivos, com a dose de 0,5 mg/kg. A partir do sexto dia, os animais passaram a receber os tratamentos. No teste de campo aberto, os parâmetros avaliados incluíram a distância total percorrida e o tempo gasto na zona central do aparato. Observou-se que a administração de LPS reduziu ambos os parâmetros, indicando um comportamento inibitório nos animais, caracterizado por menor exploração do ambiente e aumento da permanência na zona periférica. Esse comportamento sugere a presença de ansiedade nos animais expostos ao LPS, resultado que está em concordância com dados previamente descritos na literatura (Oliveira, 2021).

Por outro lado, os grupos tratados com baricitinibe ou escitalopram não apresentaram alterações estatisticamente significativas nesses parâmetros, sugerindo que, nas condições experimentais descritas, esses tratamentos não revertem os efeitos comportamentais induzidos pelo LPS nesse teste.

Para investigar se o baricitinibe apresenta atividade ansiolítica, utilizamos como parâmetro a quantidade de *head dips*, um indicativo comportamental amplamente utilizado para

avaliar ansiedade em modelos animais. Animais ansiosos tendem a evitar a exploração e preferem permanecer imóveis no aparato experimental.

Neste estudo, observou-se que no protocolo 2, a administração de LPS na dose de 0,5 mg reduziu significativamente o número de *head dips* em comparação ao grupo controle sugerindo um comportamento ansioso-símile nos animais e os grupos tratados com o escitalopram e baricitinibe não causaram efeito significativo, porém foi capaz de proteger o efeito do LPS. Em contrapartida, a dose de LPS de 1 mg não produziu o mesmo efeito. Esse resultado pode ser atribuído a um possível processo de adaptação imunológica à dose mais elevada de LPS, como se tratasse de uma modulação na expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, sugerindo uma reprogramação do sistema imunológico para minimizar danos teciduais durante exposições repetidas à endotoxina (Melo, 2008).

Nos resultados obtidos com o protocolo 3, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. E isso pode ser explicado, pois utilizou-se fêmeas, que estavam na fases do ciclo estral, estro, metaestro e diestro. O estro é uma fase caracterizada por níveis elevados de estrogênio, o que pode influenciar a resposta biológica ao LPS e ao tratamento, sendo esse um fator importante a ser considerado para entender as variações nos resultados entre os estudos e o metaestro é uma fase que há presença de estrogênio e progesterona e diestro há picos de progesterona (Azevedo, 2021) que seus efeitos decorrem na interação principalmente do seu metabólito alopregnanolona (ALLO) no receptor GABA-A, apresentando atividade ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa e anestésicas (Barbosa et al., 2019).

Para compreender melhor a ação do baricitinibe no comportamento depressivo, utilizou-se teste do nado forçado, reconhecido como padrão-ouro para avaliar comportamentos depressivos em roedores. No protocolo 1, observou-se que o tratamento com LPS não aumentou o tempo de imobilidade dos animais, enquanto o grupo tratado com fluoxetina apresentou um tempo significativamente maior de imobilidade.

Esses resultados podem ser interpretados à luz de estudos prévios, que investigaram o comportamento de camundongos geneticamente modificados para ausência do gene do transportador de serotonina (5-HTT knockout). Esses animais exibem características comportamentais semelhantes à comorbidade de ansiedade e depressão, como aumento do tempo de imobilidade. A hipótese é que a eliminação do transportador de serotonina mimetiza a ação dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), bloqueando a recaptação da serotonina e elevando sua concentração na fenda sináptica.

Esse aumento de serotonina, por sua vez, ativa excessivamente os autorreceptores pré-

sinápticos 5-HT1A, que exercem um mecanismo de feedback negativo, reduzindo a liberação adicional de serotonina. Esse fenômeno, conhecido como *downregulation* adaptativa, pode contribuir para o aumento do tempo de imobilidade observado no grupo fluoxetina no protocolo de cinco dias. Esses achados reforçam a ideia de que a ativação prolongada dos receptores 5-HT1A pode levar a alterações comportamentais associadas à depressão (Anyan; Amir, 2018).

Por outro lado, a ausência de aumento no tempo de imobilidade no grupo tratado com LPS sugere que o estímulo inflamatório agudo não foi suficiente para induzir comportamento depressivo mensurável no FST nesse modelo experimental. Isso pode estar relacionado à intensidade da resposta neuroinflamatória desencadeada pelo LPS, no protocolo 2 o grupo LPS 0,5mg e 1mg percebe-se um aumento do tempo de imobilidade, porém não foi significativo. Por outro lado, no grupo LPS 1 mg + BARI, houve uma redução significativa no tempo de imobilidade. Esse achado está em concordância com o estudo de Matsushita et al. (2022), que demonstrou um efeito do baricitinibe no teste de preferência por sacarose, um modelo preditivo de depressão, já que no protocolo 3 dias de exposição de LPS 0,5mg, observou que o LPS foi capaz de causar aumento no tempo de imobilidade, sendo um indicativo de um comportamento depressivo, resultado corroborado com o trabalho de (Oliveira, 2021). Porém os grupos tratados não tiveram resultado significativos e isso pode ser explicado devido o tempo de tratamento, pois os antidepressivos tem um tempo de latência para gerar um efeito e o baricitinibe demonstrou um efeito na nível SNC após 6 ou 7 dias de tratamento (Gavegnano et al., 2019)

Um estudo realizado por Rubin (2018), evidenciou que aproximadamente 20% das pessoas diagnosticadas com demência apresentam concomitantemente síndrome depressiva, sugerindo que a depressão em fases iniciais da vida pode constituir um fator de risco relevante para o desenvolvimento de demência. Baseando-se nessa relação, nosso estudo buscou avaliar os efeitos do baricitinibe na cognição por meio do teste de reconhecimento do objeto novo, amplamente utilizado para investigar a memória em modelos animais.

No presente estudo, os resultados mostraram que a exposição ao LPS foi capaz de diminuir o reconhecimento de objetos, indicando que, após 5 dias de exposição ao LPS, podem ocorrer danos que afetam a cognição. Esses achados corroboram outros estudos sobre os efeitos do LPS na função cognitiva, como os resultados de Oliveira (2021), que utilizou um protocolo de exposições prolongadas ao LPS por 10 dias.

Nos grupos tratados, observou-se que a fluoxetina foi eficaz em reverter os danos causados pelo LPS. Em contraste, o grupo tratado com baricitinibe não apresentou reversão significativa dos déficits cognitivos. Essa diferença pode ser atribuída ao tempo de tratamento, uma vez que o teste realizado avaliou a memória de curto prazo. Em um estudo realizado por

Gavegnano et al. (2019), foi demonstrado que o baricitinibe, administrado em doses de 10 mg/kg e 50 mg/kg, foi eficaz na reversão de déficits cognitivos relacionados à memória de longo prazo em camundongos infectados pelo vírus HIV, após 6 a 7 dias de tratamento. Nesse estudo, o teste de reconhecimento de objetos foi realizado em dois intervalos de tempo (5 minutos e 2 horas após a exposição aos objetos), com efeitos significativos observados especificamente no intervalo de 2 horas, sugerindo que o baricitinibe impacta processos de memória de longo prazo.

No estudo atual, optou-se por trabalhar com fêmeas, considerando as evidências que apontam maior susceptibilidade das mulheres ao desenvolvimento de depressão em comparação aos homens, conforme relatado pela OMS, 2023. Além disso, estudos como o de Hamson et al. (2016) indicam que mulheres são mais propensas a desenvolver formas mais graves de demência, bem como a sofrer um declínio cognitivo mais acentuado associado à doença de Alzheimer. Essas diferenças sexuais nas características e comportamentos têm sido frequentemente atribuídas ao envolvimento das flutuações hormonais, como os estrógenos e progesteronas.

Com base nesse contexto, este trabalho investigou o impacto de fatores hormonais no comportamento de modelos animais. Para as variações hormonais, foi realizado o controle do ciclo estral das fêmeas envolvidas no estudo. No protocolo 1 e 3 os camundongos estavam na fase de estro, enquanto no protocolo 2 estavam na fase metaestro e diestro. A fase estro é caracterizada por alta receptividade e níveis elevados de estrógenos. O estrógeno é um hormônio esteroide, exerce seus efeitos por meio da ligação aos receptores (ER α) e o (ER β), os quais podem atuar como fatores de transcrição, regulando diretamente a expressão gênica ou modulando outras vias de sinalização intracelulares (Mishra; Davies; Albensi, 2023).

Evidências científicas indicam que o estrogênio desempenha um papel crucial na regulação da inflamação no SNC, particularmente por meio da redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Esse efeito anti-inflamatório do estrogênio está associado à sua ação neuroprotetora contra doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Hamson; Roes; Galea, 2016b). A neuroinflamação crônica é um dos principais fatores contribuintes para a neurodegeneração, e o fator nuclear kappa-B (NF- κ B) é um regulador central da resposta inflamatória. O estrogênio, especialmente na forma de 17 β -estradiol (E2), demonstrou inibir a ativação do NF- κ B, o que resulta na redução da transcrição de genes relacionados à inflamação no SNC. Esse mecanismo ajuda a diminuir os danos neuronais induzidos pela inflamação crônica, contribuindo para efeitos neuroprotetores em condições neurodegenerativas (Yan et al., 2023).

As fases de metaestro e diestro no ciclo estral são marcadas por uma redução nos níveis de estrogênio e pelo predomínio de progesterona, que atinge picos elevados na fase diestro.

Embora o estrogênio esteja presente em quantidades reduzidas durante essas fases, ele desempenha um papel significativo na regulação neural, incluindo a interação com o sistema GABAérgico. O estrogênio modula a atividade do receptor GABA-A, influenciando a neurotransmissão inibitória e contribuindo para a regulação do equilíbrio neural e do comportamento emocional (Barbosa et al., 2019).

Além disso, a progesterona, sintetizada tanto nos ovários quanto *in situ* no sistema nervoso central, também exerce efeitos substanciais sobre o sistema GABAérgico. Seu metabólito ativo, a alopregnanolona (ALLO), se liga com alta afinidade aos receptores GABA-A, aumentando a eficácia da neurotransmissão inibitória. Essa interação resulta em propriedades ansiolíticas, anticonvulsivantes, sedativas e anestésicas, que são amplamente documentadas na literatura científica (Reddy, 2010).

Estudos experimentais com modelos animais demonstraram que a progesterona e seus metabólitos possuem efeitos neuroprotetores. Em pesquisas envolvendo lesões do nervo ciático, foi observado que a progesterona promove a mielinização e acelera o reparo neuronal. Além disso, em modelos de degeneração neural, como no sistema dopaminérgico, a progesterona apresentou propriedades protetoras, possivelmente mediadas por sua capacidade de modular tanto os receptores GABA-A quanto outros sistemas neuroquímicos relacionados.

Dessa forma, a interação do estrogênio e da progesterona com o sistema GABAérgico destaca sua importância não apenas na regulação do ciclo reprodutivo, mas também na manutenção da homeostase neural e no desenvolvimento de potenciais intervenções terapêuticas (Barbosa et al., 2019).

Além disso, este trabalho buscou investigar a atividade anti-inflamatória do baricitinibe no hipocampo de animais submetidos à administração de LPS. Observou-se que o LPS não aumentou significativamente os níveis de citocinas inflamatórias em comparação ao grupo controle. Esse achado pode ser justificado pelo protocolo de exposição ao LPS, que, segundo Rebouças (2024), é associado a danos e aumento de citocinas em protocolos com 10 dias de duração. Assim, é possível inferir que o tempo de exposição empregado neste estudo não foi suficiente para provocar um aumento expressivo dos danos inflamatórios.

Nos grupos tratados com fluoxetina, é importante destacar que o mecanismo de ação desse fármaco está relacionado à inibição seletiva da recaptação de serotonina, não diretamente à modulação de citocinas. No caso do baricitinibe, os resultados não evidenciam uma redução significativa para proporcionar um efeito anti-inflamatório, possivelmente devido ao tempo

limitado de tratamento. Esses fatores ressaltam a necessidade de estudos adicionais para elucidar o impacto do tempo de exposição e tratamento no contexto investigado.

Nesse contexto, esse estudo sugere que o protocolo experimental de 5 dias não foi suficientemente sensível para detectar alterações significativas no comportamento depressivo. No entanto, esse protocolo foi eficaz em causar danos que puderam ser mensurados por meio de testes preditivos de ansiedade e função cognitiva. Por outro lado, o protocolo de 10 dias foi capaz de induzir danos que previram comportamentos ansiosos, além de evidenciar um comportamento depressivo no teste do nado forçado.

É importante destacar que algumas variáveis podem ter influenciado os resultados, uma vez que este estudo foi conduzido com camundongos fêmeas, as quais apresentam flutuações hormonais ao longo de seu ciclo estral, o que pode ter interferido nas respostas comportamentais observadas.

Além disso, destaca-se que o baricitinibe demonstrou atividade relevante em modelos celulares utilizando astrócitos e células PC12, apresentando efeitos protetores contra a morte celular, baixa toxicidade e propriedades anti-inflamatórias. Contudo, em estudos *in vivo*, os resultados não foram estatisticamente significativos. Observou-se, que não houve reversão dos efeitos induzidos pelo LPS. Es sugere que estudos adicionais são necessários para compreender melhor os mecanismos de ação, incluindo a extensão do tempo de tratamento e o emprego do ativo puro em vez do comprimido revestido.

A utilização de comprimidos revestidos de baricitinibe foi uma limitação, uma vez que dificultou a determinação exata da dose efetivamente ingerida pelos animais. Além disso, o tempo de tratamento utilizado pode ter sido insuficiente para permitir uma avaliação abrangente dos potenciais efeitos protetores do fármaco. Outro aspecto relevante a ser considerado é o impacto do estado fisiológico e comportamental dos animais na sensibilidade ao medicamento. Por exemplo, estudos anteriores, como o Dossat et al. (2018) mostraram que fêmeas da linhagem C57BL/6J em fase receptivas (estro) não responderam a baixas doses de cetamina, enquanto fêmeas não receptivas e machos demonstraram resposta ao mesmo tratamento.

Adicionalmente, a ausência de um grupo controle composto por machos representou uma limitação significativa neste estudo. Essa lacuna dificultou a análise comparativa entre os sexos e a avaliação do impacto potencial de hormônios, como o estrogênio, sobre os resultados observados. Estudos futuros devem considerar essas variáveis para fornecer uma análise mais robusta e detalhada sobre os efeitos do baricitinibe em diferentes contextos experimentais.

8.0 CONCLUSÃO

Neste estudo, concluiu-se que o baricitinibe demonstrou atividade protetora em células astrócitos e PC12, promovendo proteção contra apoptose, necrose e morte celular. O composto também protegeu a integridade da membrana mitocondrial e reduziu o estresse oxidativo induzido por LPS. Nos experimentos *in vivo*, os resultados sugerem que a fase do ciclo estral, bem como a presença de estrogênio e progesterona, influência nos desfechos, possivelmente devido ao papel protetor desses hormônios. Esses achados reforçam a necessidade de estudos futuros com camundongos fêmeas e machos para elucidar melhor a interação entre flutuações hormonais e doenças neuropsiquiátricas.

Além disso, o protocolo de administração de LPS por cinco dias mostrou-se eficaz em induzir danos, evidenciados por comportamentos ansiosos e déficits cognitivos. No entanto, o protocolo não foi suficiente para causar comportamentos depressivos em fêmeas, porém no protocolo de dez dias foi visto que o LPS causou danos suficientes para causar comportamento depressivo-símile. O baricitinibe apresentou efeitos protetores nos testes *in vitro*, nos testes *in vivo*, evidenciou a importância de testes comportamentais com camundongos fêmeas e a interação das flutuações hormonais e o sistema nervoso central. Assim, sugere-se a realização de novos estudos que explorem tratamentos mais prolongados com o baricitinibe, visando compreender melhor seu potencial terapêutico em doenças neuropsiquiátricas, considerando a proteção observada em células do sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

- ABU-TAHA, May; RIUS, J. et al. *Doses of Estrogen or Losartan*. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 2, p. 1393–1402, 15 jul. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803157>.
- ALI, T. et al. *Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation*. *Journal of Pineal Research*, v. 69, n. 2, 2020.
- ALTEMUS, M. *Neuroendocrine Networks and Functionality*. *Medical Clinics of North America*, v. 103, n. 4, p. 601–612, jul. 2019.
- AMORETTI, M. C.; LALUMERA, E. *Harm should not be a necessary criterion for mental disorder: some reflections on the DSM-5 definition of mental disorder*. *Theoretical Medicine and Bioethics*, v. 40, n. 4, p. 321–337, 18 ago. 2019.
- ANYAN, J.; AMIR, S. *Too Depressed to Swim or Too Afraid to Stop? A Reinterpretation of the Forced Swim Test as a Measure of Anxiety-Like Behavior*. *Neuropsychopharmacology*, v. 43, n. 5, p. 931–933, abr. 2018.
- BARBOSA, B. N. et al. *Neuroesteroides e esquizofrenia: a função do estrogênio e da progesterona na modulação e proteção do cérebro*. *Debates em Psiquiatria*, v. 9, n. 1, p. 32–44, 29 mar. 2019.
- BARTKIENE, E. et al. *The Perspectives Associated With the Computer-Based Diagnostic Method of Depressive Disorder*. *Frontiers in Psychiatry*, v. 9, 19 dez. 2018.
- BELLEAU, E. L.; TREADWAY, M. T.; PIZZAGALLI, D. A. *The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology*. *Biological Psychiatry*, v. 85, n. 6, p. 443–453, 2019.
- BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. *The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble*. *Neuron*, v. 107, n. 2, p. 234–256, 2020.
- BHATT, S.; NAGAPPA, A. N.; PATIL, C. R. *Role of oxidative stress in depression*. *Drug Discovery Today*, v. 25, n. 7, p. 1270–1276, 2020. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.04.017.
- BYERS, S. L. et al. *Mouse estrous cycle identification tool and images*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2012.
- CHEN, L. et al. *Three methods of behavioural testing to measure anxiety – A review*. *Behavioural Processes*, v. 215, p. 104997, fev. 2024.
- CONDITIONS, O. C. *Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions*. *Cells*, v. 9, 2020.

- CRIDER, A.; PILLAI, A. *Estrogen signaling as a therapeutic target in neurodevelopmental disorders*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 360, n. 1, p. 48–58, 2017.
- DUAN, W. et al. *New role of JAK2/STAT3 signaling in endothelial cell oxidative stress injury and protective effect of melatonin*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e57941, 2013.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data*. *Behavioural Brain Research*, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.
- FAKRA, E.; MAROTTE, H. *Depression and inflammation in rheumatoid arthritis: a bidirectional relationship*. *Joint Bone Spine*, v. 88, n. 2, p. 105–110, 2021. DOI: 10.1016/j.jbspin.2020.07.008.
- FILE, S. E.; WARDILL, A. G. *Validity of Head-Dipping as a Measure of Exploration in a Modified Hole-Board*. *Psychopharmacologia (Berl.)*, Springer-Verlag, 1975.
- GAVEGNANO, C. et al. *Baricitinib reverses HIV-associated neurocognitive disorders in a SCID mouse model and reservoir seeding in vitro*. *Journal of Neuroinflammation*, v. 16, n. 1, p. 1–13, 27 set. 2019. DOI: 10.1186/s12974-019-1565-6.
- GIRIDHARAN, M. et al. *Mind and skin: Exploring the links between inflammation, sleep disturbance and neurocognitive function in patients with atopic dermatitis*. *Allergy*, v. 79, n. 6, p. 26–36, 2024. DOI: 10.1111/all.15818.
- HAMSON, D. K.; ROES, M. M.; GALEA, L. A. M. *Sex hormones and cognition: neuroendocrine influences on memory and learning*. *Comprehensive Physiology*, v. 6, n. 3, p. 1295–1337, 2016.
- KÖHLER, O. et al. *Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. *JAMA Psychiatry*, v. 71, n. 12, p. 1381–1391, 2014. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2014.1611.
- LEVY, D. E.; DARNEll, J. E. *STATs: transcriptional control and biological impact*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 3, n. 9, p. 651–662, 1 set. 2002. DOI: 10.1038/nrm909.
- LI, H. et al. *Comparative efficacy and acceptability of neuromodulation procedures in the treatment of treatment-resistant depression: a network meta-analysis of randomized controlled trials*. *Journal of Affective Disorders*, v. 287, p. 115–124, 2021. DOI: 10.1016/j.jad.2021.03.019.
- MALEMUD, C. J.; MILLER, A. H. *Pro-inflammatory cytokine-induced SAPK/MAPK and JAK/STAT in rheumatoid arthritis and the new anti-depression drugs*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 12, n. 2, p. 171–183, 2008. DOI: 10.1517/14728222.12.2.171.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. *Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4A, p. 609–614, 2002. DOI: 10.1590/S1519-69842002000400008.

MCLEAN, A. C.; BYRNE, A. M.; KERLIN, R. L. *Protocol for vaginal lavage to collect cells from mice for cytological evaluation*. Journal of Visualized Experiments, n. 4389, 2012. DOI: 10.3791/4389.

MISHRA, P.; DAVIES, D. A.; ALBENSI, B. C. *The Interaction Between NF- κ B and Estrogen in Alzheimer's Disease*. Molecular Neurobiology, v. 60, n. 3, p. 1515–1526, 13 mar. 2023.

NELSON, L. R.; BULUN, S. E. *Estrogen production and action*. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 178, n. 1-2, p. 117–124, 2001. DOI: 10.1067/mjd.2001.117432.

OLIVEIRA, Andressa Alexandre de. *Avaliação do potencial antidepressivo e mnemônico da glimepirida em camundongos submetidos a administração repetida do lipopolissacarídeo de Escherichia coli*. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2021.

PANDHARIPANDE, M. et al. *Association between oxidative stress, inflammation, and major depressive disorder: a systematic review*. Brain, Behavior, and Immunity, v. 108, p. 266–275, 2023. DOI: 10.1016/j.bbi.2022.12.020.

RAJENDRAN, P. et al. *Mechanisms of neuroinflammation and anti-inflammatory therapeutic approaches in Alzheimer's disease*. Journal of Neuroinflammation, v. 19, n. 1, p. 1–30, 2022. DOI: 10.1186/s12974-022-02556-1.

RIPOLL, V. M.; BELLAMKONDA, N.; KONAT, G. W. *Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation induces presynaptic disruption through a direct action on brain tissue involving microglia-derived interleukin 1 beta*. Journal of Neuroinflammation, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2013. DOI: 10.1186/1742-2094-10-1.

SHARMA, A. et al. *Estradiol-17 β reverses depression-like behavior in ovariectomized rats via activation of PI3K/Akt pathway*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 225, p. 173275, 2023.

SHARMA, S. K. et al. *Melatonin ameliorates lipopolysaccharide-induced oxidative stress, neuroinflammation, and memory impairment in rats*. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 132, p. 110895, 2020.

SINGH, P.; BORA, H. M.; SINGH, S. *Neuroprotective effects of estrogen and estrogen receptors in the brain: implications for depression*. Brain Research Bulletin, v. 187, p. 41–52, 2023.

SPENCER, J. C. et al. *Antidepressant effects of estrogen in animal models of depression: a systematic review and meta-analysis*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 131, p. 468–485, 2021.

SUE, C. M. et al. *Effects of estrogen on memory and anxiety-like behaviors in rodents: A meta-analytic review*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 133, p. 892–903, 2022.

VALLÉS, S. L. et al. *Melatonin prevents lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in the rat brain through NF- κ B pathway inhibition*. Neurochemistry International, v. 97, p. 25–34, 2016.

APÊNDICE

Tabela 1: Resumo dos resultados do protocolo 1 obtidos após o tratamento com baricitinibe e fluoxetina em animais submetidos à exposição ao LPS.

Protocolo 1 (In vivo)						
Testes comportamentais e neuroquímicos	CT	SAL + BARI	SAL + FLU	LPS 0,5 mg/kg	LPS 0,5 mg/kg + BARI	LPS 0,5 mg/kg + FLU
Campo aberto – distância percorrida	NS	NS	NS	↓ distância percorrida	NS	NS
Campo aberto – tempo na zona central	NS	NS	NS	↓ tempo na zona central	NS	NS
Nado forçado	NS	NS	↑ tempo de imobilidade	↓ tempo na zona central	NS	NS
Reconhecimento do objeto novo	NS	↓ índice de reconhecimento	↑ tempo de imobilidade	↓ tempo na zona central	NS	NS
Citocina TNF-α	NM	NM	NM	NM	NM	NM
Citocina IL-6	NM	NM	NM	NM	NM	NM
Ciclo Estral	Estro					

↑ aumento significativo ($p<0,05$); ↓ diminuição significativa ($p<0,05$); NS: não significativo; NM: não mensurado; SAL: salina; LPS: lipopolissacarídeo; BARI: baricitinibe; FLU: fluoxetina.

Tabela 2: Resumo dos resultados do protocolo 2 obtidos após o tratamento com baricitinibe e escitalopram em animais submetidos à exposição ao LPS.

PROTOCOLO 2						
Testes comportamentais	CT	LPS 0,5 mg/kg	LPS 1 mg/kg	LPS 0,5 mg/kg + BARI	LPS 1 mg/kg + BARI	LPS 0,5 mg/kg + ESC
Campo aberto – distância percorrida	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Campo aberto – tempo na zona central	NS	NS	↓ tempo na zona central	↓ tempo na zona central	NS	NS
Placa perfurada (<i>hole-board</i>)	NS	↓ número de mergulhos	NS	NS	NS	NS
Nado Forçado	NS	NS	NS	NS	↓ tempo de imobilidade	NS
Ciclo Estral	Metaestro e Diestro					

↑ aumento significativo ($p<0,05$); ↓ diminuição significativa ($p<0,05$); NS: não significativo; NM: não mensurado; SAL: salina; LPS: lipopolissacarídeo; BARI: baricitinibe; ESC: escitalopram.

Tabela 3: Resumo dos resultados do protocolo 3 obtidos após o tratamento com baricitinibe e fluoxetina em animais submetidos à exposição ao LPS.

PROTOCOLO 3				
Testes comportamentais	CT	LPS 0,5 mg/kg	LPS 0,5 mg/kg + BARI	LPS 0,5 mg/kg + ESC
Campo aberto – distância percorrida	NS	↓ distância percorrida	NS	NS
Campo aberto – tempo na zona central	NS	↓ tempo na zona central	NS	NS
Placa perfurada (<i>hole-board</i>)	NS	NS	NS	NS
Nado Forçado	NS	↑ tempo de imobilidade	NS	NS
Ciclo Estral	Metaestro			

↑ aumento significativo ($p<0,05$); ↓ diminuição significativa ($p<0,05$); NS: não significativo; NM: não mensurado; SAL: salina; LPS: lipopolissacarídeo; BARI: baricitinibe; ESC: escitalopram.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA.



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

Universidade Federal do Ceará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do potencial antidepressivo de colchicina e baricitinibe em modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli em camundongos C57BL/6", protocolada sob o CEUA nº 2015120523 (000004), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa** e equipe; Paolla Emanuela Carvalho de Oliveira; Jardja Stéfane Lopes Sales; Larice de Carvalho Vale; Manoela de Oliveira Rebouças; Sheila Mara Aires Bandeira; Guendalina Giulia Corsi; Ketsya Oliveira dos Santos Albuquerque; Letícia Rizza de Freitas Magalhães - 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 14/07/2023.

We certify that the proposal "Investigation of the antidepressant potential of colchicine and baricitinib in a model of neuroinflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli in C57BL/6 mice", utilizing 300 Isogenic mice (300 females), protocol number CEUA 2015120523 (000004), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa** and team; Paolla Emanuela Carvalho de Oliveira; Jardja Stéfane Lopes Sales; Larice de Carvalho Vale; Manoela de Oliveira Rebouças; Sheila Mara Aires Bandeira; Guendalina Giulia Corsi; Ketsya Oliveira dos Santos Albuquerque; Letícia Rizza de Freitas Magalhães - 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 07/14/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 07/2023 a 12/2025 Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Fêmeas

idade: 42 a 48 dias Quantidade: 300

Linhagem: C57BL/6 Peso: 22 a 29 g

Fortaleza, 03 de agosto de 2023

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

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