



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

**LARICE DE CARVALHO VALE BENNAZIR**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA RIPARINA III APÓS EXPOSIÇÃO AO  
LIPOPOLISSACARÍDEO – MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTO DEPRESSIVO,  
REVERSÃO DE DANOS CELULARES *in vitro* E ENVOLVIMENTO DA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL**

**FORTALEZA – CE**

**2025**

LARICE DE CARVALHO VALE BENNAZIR

EFEITO NEUROPROTETOR DA RIPARINA III APÓS EXPOSIÇÃO AO  
LIPOPOLISSACARÍDEO – MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTO DEPRESSIVO,  
REVERSÃO DE DANOS CELULARES *in vitro* E ENVOLVIMENTO DA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL

Tese 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 Doutora em Farmacologia. Área de concentração: neuropsicofarmacologia.

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

FORTALEZA

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)

---

B417e    Bennazir, Larice de Carvalho Vale.

Efeito neuroprotetor da Riparina III após exposição ao lipopolissacarídeo - modulação de comportamento depressivo, reversão de danos celulares in vitro e envolvimento da óxido nítrico sintase induzível / Larice de Carvalho Vale Bennazir. – 2025.

136 f. : il. color.

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

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

Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

1. Inflamação . 2. Astrócitos. 3. Ansiedade. 4. Depressão. I. Título.

CDD 615.1

---

LARICE DE CARVALHO VALE BENNAZIR

EFEITO NEUROPROTETOR DA RIPARINA III APÓS EXPOSIÇÃO AO  
LIPOPOLISSACARÍDEO – MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTO DEPRESSIVO,  
REVERSÃO DE DANOS CELULARES *in vitro* E ENVOLVIMENTO DA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL

Tese 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 Doutora em Farmacologia. Área de concentração: neuropsicofarmacologia.

APROVADA EM 15 / 12 / 2025

BANCA EXAMINADORA:

---

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

---

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

---

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

---

Prof. Dra. Paloma Katlheen Moura Melo  
Unicatólica do RN

---

Prof. Dr. Thiago Meneses Araújo Leite Sales  
Universidade Federal do Ceará e Estácio de Sá

---

Prof. Dra. Lelia Sales de Sousa  
UNICHRISTUS

Ao meu esposo

À minha mãe e irmãos

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à minha Mãe Maria Santíssima e aos Santos São Josemaria Escrivá e São José, meus grandes santos de devoção, que sempre ouviram minhas súplicas e me conduziram a Deus, mesmo diante da minha pequenez.

Expresso minha profunda gratidão aos meus familiares, em especial à minha mãe Ireny Gonçalves, aos meus irmãos Leonardo e Leticia e ao meu cunhado Josiel, por suportarem minhas chatices. Obrigada por tanto amor e apoio incondicional, mesmo à distância.

Ao meu lindo e admirável Omar Bennazir, cujo exemplo de força, dedicação e coragem sempre me lembrou da importância de encontrar luz em meio às dificuldades. Como ele diz: "tudo é graça de Deus, e devemos agradecer".

Quero expressar minha sincera gratidão à minha estimada orientadora, Professora Cléa, por permanecer ao meu lado, por tantas conversas, conselhos e orientações, além dos nossos momentos de café. Você é um exemplo para mim.

Agradeço também ao meu coorientador Tiago Sampaio, sempre solícito, alegre e repleto de conhecimento para compartilhar. Obrigada por me acolher em seu querido laboratório.

Aos meus companheiros de experimentos diários, Manoela, Daniel e Victor, que estiveram comigo compartilhando as alegrias e dificuldades da vida de pesquisador, trocando sorrisos, frustrações e conhecimento.

Às estudantes de iniciação científica pela disponibilidade, dedicação e seriedade na execução dos experimentos, em especial Letícia, Ketsya, Guenda e Paolla. Vocês se tornaram mais do que meras colegas de iniciação científica.

Ao Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), em especial à professora Alice, pela parceria, acompanhada de muito apoio e colaboração. Agradeço à Izabell e ao Emanuel, cuja dedicação e expertise foram fundamentais para minha pesquisa. Suas contribuições têm sido inestimáveis para mim.

Ao Mac Dionys, pelas simulações de *docking* molecular, acompanhadas de cuidado e esmero com todo o protocolo, organização dos dados e explicações pertinentes.

Aos professores doutores que participaram da banca, por estarem disponíveis para contribuir neste dia tão especial.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI), em especial à Ludimila, Junior e Josy, pela ajuda inestimável com a realização de um procedimento de Imunohistoquímica.

Agradeço ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Paraíba, representado pelo Professor Barbosa Filho e Jailton Ferrari, que gentilmente nos cederam a Riparina III e forneceram todas as informações necessárias para a concretização deste trabalho.

Minha gratidão à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa de estudo concedida. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, minha eterna gratidão.

“Põe um motivo sobrenatural na tua atividade profissional de cada dia, e terás santificado o trabalho.” (São Josemaria Escrivá, Caminho 359)



## RESUMO

A depressão é uma doença cuja fisiopatologia ainda não foi completamente elucidada. O tratamento convencional, que se baseia principalmente na teoria monoaminérgica, enfrenta desafios significativos, como a demora na manifestação dos efeitos terapêuticos e a ocorrência de efeitos colaterais. Nesse contexto, a teoria da neuroinflamação tem ganhado destaque crescente, sustentada pela observação de que a desregulação de processos inflamatórios pode estar relacionada ao início e à persistência da depressão. Nesse cenário, a Riparina III (Rip III) apresenta-se como uma substância sintética promissora, dado seu potencial já demonstrado como agente antidepressivo e ansiolítico, bem como suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Dessa forma, este trabalho objetivou investigar o efeito da Rip III em modelo *in vivo* e *in vitro* após exposição ao Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Para isso, utilizou-se camundongos machos da linhagem C57BL/6, e submetidos a um modelo de administração intraperitoneal de LPS na dose de 0,5 mg/kg (i.p.) por 10 dias. A partir do 5º dia, os camundongos foram tratados, via oral, com Rip III (50 mg/kg), salina (0,9%) ou Escitalopram (10mg/kg). No último dia do experimento, foram realizados testes comportamentais preditivos de depressão (Nado Forçado e Teste de Preferência à Sacarose), locomoção, exploração e ansiedade (Campo Aberto, Teste do Labirinto em Cruz Elevada, Placa Perfurada) e memória (Labirinto em Y). Em seguida, os animais foram eutanasiados e as amostras cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) retiradas e devidamente armazenadas para determinação de nitrito, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, além das citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$ . No âmbito *in vitro*, avaliou-se o efeito da Rip III, nas concentrações entre 1000 e 15,6  $\mu$ M, sobre a viabilidade de células PC12 e astrócitos pelo ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT). Adicionalmente, ensaios de citometria de fluxo foram realizados a fim de avaliar mecanismos de morte celular (por marcação de Iodeto de Propídio (PI) e Anexina V (Anx V)), e potencial transmembrânico mitocondrial (marcação com Rodamina). Alterações morfológicas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e óptica. Para identificar possíveis alvos moleculares, foi realizado um *docking molecular*. O estudo revelou que a Rip III reverteu o comportamento depressivo-símile induzido por LPS, além de melhorar parâmetros ansiolíticos, exploratórios e de memória de curto prazo. Dos marcadores analisados, a Rip III reduziu TBARS e nitrito. *In vitro*, a Riparina III ocasionou uma redução na viabilidade

celular na concentração de 1000  $\mu$ M em linhagem de PC12 e nas concentrações de 500 e 1000  $\mu$ M nos astrócitos, sendo estas excluídas das fases seguintes. Em contrapartida, protegeu células PC12 e astrócitos da perda estrutural induzida por LPS, efeito corroborado pela redução de marcação positiva para PI/Anexina V e da preservação do potencial transmembrana mitocondrial. O docking molecular indicou interações relevantes com a iNOS (resíduos Glu371, Arg382 e Grupo Heme), sugerindo este como possível alvo terapêutico. Esses achados reforçam o potencial neuroprotetor e anti-inflamatório da Rip III e incentivam novos estudos para elucidar seus mecanismos na neuroinflamação.

**Palavras-chave:** inflamação; astrócitos; ansiedade; depressão.

## ABSTRACT

### NEUROPROTECTIVE EFFECT OF RIPARIN III AFTER LIPOPOLYSACCHARIDE EXPOSURE: MODULATION OF DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR, REVERSAL OF IN VITRO CELLULAR DAMAGE, AND INVOLVEMENT OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE

Depression is a disorder whose pathophysiology has not yet been fully elucidated. Conventional treatment, largely based on the monoaminergic theory, faces significant limitations, including delayed onset of therapeutic effects and the occurrence of adverse side effects. In this context, the neuroinflammation hypothesis has gained increasing attention, supported by evidence that dysregulation of inflammatory processes may be associated with the onset and persistence of depressive disorders. Within this framework, Riparin III (Rip III) emerges as a promising synthetic compound, given its previously demonstrated antidepressant and anxiolytic potential, as well as its anti-inflammatory and antioxidant properties. Thus, this study aimed to investigate the effects of Rip III in both in vivo and in vitro models following exposure to *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). Male C57BL/6 mice were subjected to an intraperitoneal LPS administration protocol (0.5 mg/kg, i.p.) for 10 consecutive days. From day 5 onward, animals received oral treatment with Rip III (50 mg/kg), saline (0.9%), or escitalopram (10 mg/kg). On the final day of the experiment, behavioral tests predictive of depressive-like behavior (Forced Swim Test and Sucrose Preference Test), locomotion, exploration, and anxiety-related behaviors (Open Field Test, Elevated Plus Maze, and Hole-Board Test), as well as short-term memory (Y-Maze), were performed. Subsequently, animals were euthanized, and brain tissues (prefrontal cortex and hippocampus) were collected and properly stored for the determination of nitrite levels, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$ . In the in vitro assays, the effects of Rip III at concentrations ranging from 1000 to 15.6  $\mu$ M on the viability of PC12 cells and astrocytes were evaluated using the MTT reduction assay. Additionally, flow cytometry analyses were performed to assess cell death mechanisms through propidium iodide (PI) and Annexin V (Anx V) staining, as well as mitochondrial transmembrane potential using rhodamine staining. Morphological alterations were evaluated by scanning electron microscopy and light microscopy. To identify potential molecular targets, molecular docking analyses were conducted. The study demonstrated that Rip III reversed LPS-induced depressive-like

behavior and improved anxiety-related, exploratory, and short-term memory parameters. Rip III also reduced TBARS and nitrite levels. In vitro, Riparin III reduced cell viability at 1000  $\mu$ M in PC12 cells and at 500 and 1000  $\mu$ M in astrocytes, and these concentrations were excluded from subsequent experimental phases. Conversely, Rip III protected both PC12 cells and astrocytes from LPS-induced structural damage, an effect supported by reduced PI/Annexin V positivity and preservation of mitochondrial transmembrane potential. Molecular docking indicated relevant interactions with inducible nitric oxide synthase (iNOS), particularly involving residues Glu371, Arg382, and the heme group, suggesting this enzyme as a potential therapeutic target. These findings reinforce the neuroprotective and anti-inflammatory potential of Rip III and encourage further studies to elucidate its mechanisms of action in neuroinflammatory conditions.

**Keywords:** inflammation; astrocytes; anxiety; depression.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomas do transtorno depressivo maior.....	17
Figura 2 - Hipóteses das causas da depressão .....	23
Figura 3 - Visão da estrutura esquemática das bactérias Gram-negativa.....	29
Figura 4- Estrutura do LPS.....	30
Figura 5 - Da planta à substância sintética .....	39
Figura 6 - Substâncias utilizadas no modelo in vivo.....	46
Figura 7 - Fluxograma do protocolo experimental .....	47
Figura 8 - Teste do Nado Forçado .....	49
Figura 9 - Teste de preferência pela Solução de Sacarose .....	50
Figura 10 - Teste do Campo Aberto .....	51
Figura 11 - Teste da Placa Perfurada .....	52
Figura 12 - Teste do labirinto em cruz elevado .....	53
Figura 13 - Teste do Labirinto em Y .....	55
Figura 14 - Protocolo de determinação dos níveis de nitrito .....	56
Figura 15 - Princípio do Teste do MTT .....	61
Figura 16 - Princípio do teste de avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial por Rodamina.....	64
Figura 17 - Efeito da Riparina III sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado .....	68
Figura 18 - Efeito da Riparina III sobre o comportamento anedônico no Teste de Preferência à Sacarose .....	69
Figura 19 - Efeito da Riparina III sobre parâmetros preditivos de locomoção, exploração e ansiedade-símile no Teste do Campo Aberto .....	72
Figura 20 - Mapa de trajetória do animal e mapa de calor de permanência do animal nas áreas.....	73
Figura 21 - Efeito da Riparina III sobre o número de mergulhos no Teste da Placa Perfurada.....	74
Figura 22 - Efeito da administração de Riparina III sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A), e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B), no teste do Labirinto de Cruz Elevada .....	75

Figura 23 - Efeito da administração de Riparina III sobre a memória de curto prazo no Teste do Labirinto em Y .....	76
Figura 24 - Efeitos da Riparina sobre a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao LPS .....	77
Figura 25 - Efeitos da Riparina sobre a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao LPS .....	78
Figura 26 - Efeitos da Riparina sobre a concentração de nitrito ( $\mu\text{M/g}$ de tecido) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos expostos ao LPS .....	79
Figura 27 - Efeito da Riparina III nos níveis de citocinas: Interleucina $1\beta$ ( $\text{IL}1\beta$ ) e Interleucina-6 ( $\text{IL-6}$ ) em hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente, de animais submetidos ao LPS .....	81
Figura 28 - Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a ação da Riparina III na viabilidade de células PC12 e astrócitos .....	82
Figura 29 - Efeito da Riparina III no potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) de astrócitos e PC12 .....	84
Figura 30 - Avaliação dos mecanismos de morte celular por marcação de Iodeto de Propídio (PI) e Anexina V (Ax) em astrócitos e células PC12 desafiados por LPS e tratadas com Riparina III .....	86
Figura 31 - Representação da morfologia das células PC12 e Astrócitos através da técnica de Microscopia Óptica.....	87
Figura 32 - Representação da morfologia das células PC12 e Astrócitos através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	89
Figura 33 - Região de ancoragem da melhor pose dos ligantes na proteína-alvo ....	90
Figura 34 - Mapa 2D das interações entre o inibidor INE e a subunidade A da iNOS .....	94
Figura 35 - Mapa 2D das interações entre o inibidor L-Name e a subunidade A da iNOS.....	94
Figura 36 - Mapa 2D das interações entre a Riparina III e a subunidade A da iNOS	95
Figura 37 - Mapa mental resumido dos benefícios da Riparina sobre o Sistema Nervoso Central .....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura IUPAC e estrutura 2D das Riparinas.....	37
Tabela 2 - Organização dos grupos experimentais .....	47
Tabela 3 - Percentual de viabilidade das células PC12 e astrócitos tratadas com diferentes concentrações de Riparina ( $\mu\text{M}$ ).....	83
Tabela 4 - Energia de afinidade ( $\Delta G$ ) e RMSD da melhor pose de cada ligante.....	91
Tabela 5 - Interações entre os resíduos da proteína-alvo e a estrutura química dos ligantes.....	92

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Depressão e seus mecanismos fisiopatológicos .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Hipóteses sobre os mecanismos patogênicos da depressão: explorando os caminhos da compreensão .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Hipótese inflamatória da depressão .....	23
1.2.1.1 Lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Escherichia coli</i> : Implicações na Depressão....	28
<b>1.3 Astrócitos e PC12 no Sistema Nervoso Central .....</b>	<b>33</b>
<b>1.4 Características e propriedades das riparinas .....</b>	<b>34</b>
1.4.1 Riparina III: uma abordagem promissora na neuroinflamação induzida por LPS .....	38
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>42</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 Geral .....	44
3.2 Específicos .....	44
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Ensaios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>45</b>
4.1.1 Animais experimentais e aspectos éticos .....	45
4.1.2 Substâncias utilizadas .....	45
4.1.3 Desenho experimental.....	46
4.1.4 Avaliações comportamentais preditivas de depressão.....	48
4.1.4.1 Teste do Nado Forçado.....	48
4.1.4.2 Teste de Preferência por Sacarose.....	49
4.1.5 Avaliações comportamentais preditivas de locomoção e ansiedade.....	51
4.1.5.1 Teste do Campo Aberto .....	51
4.1.5.2 Teste da placa perfurada.....	52
4.1.5.3 Teste do labirinto em cruz elevado.....	53
4.1.6 Avaliação comportamental preditiva de memória .....	54
4.1.6.1 Teste do Labirinto em Y .....	54
<b>4.1.7 Avaliação Neuroquímica .....</b>	<b>55</b>
4.1.7.1 Determinação dos níveis de nitrito .....	55
4.1.7.2 Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	56



4.1.7.3 Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH) .....	57
<b>4.2 Ensaios <i>in vitro</i></b> .....	58
4.2.1 Obtenção e diluição da Riparina III .....	58
4.2.2 Lipopolissacarídeo .....	58
4.2.3 Manutenção e cultivo celular .....	59
4.2.4 Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT .....	59
Fonte: Elaborada pela autora .....	61
4.2.6 Avaliação das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	62
4.2.7 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial .....	63
<b>4.3 Análise estatística</b> .....	65
<b>4.4 Estudo <i>in silico</i></b> .....	65
4.4.1 Preparação dos ligantes e da proteína-alvo .....	65
4.4.2 Simulação de docking molecular e obtenção dos resultados .....	66
<b>5 RESULTADOS</b> .....	67
<b>5.1 Testes Comportamentais</b> .....	67
5.2.1 Testes preditivos de depressão.....	67
5.2.1.1 Efeito da administração da Riparina III sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado .....	67
5.2.1.2 Efeito da administração da Riparina III sobre o comportamento anedônico em camundongos submetidos ao teste de preferência pela solução de sacarose .....	68
5.2.2 Testes preditivos de locomoção e ansiedade.....	69
5.2.2.1 Efeito da administração da Riparina III sobre a atividade locomotora, exploratória e de ansiedade-símile em camundongos submetidos ao teste do campo aberto .....	69
5.2.2.2 Efeito da administração da Riparina III sobre a atividade locomotora, exploratória e de ansiedade-símile em camundongos submetidos ao teste da placa perfurada.....	74
5.2.2.3 Efeito da administração da Riparina III sobre o comportamento de ansiedade-símile no teste do labirinto em cruz elevada .....	75
5.2.3 Teste preditivo de memória de curto prazo .....	76
5.2.3.1 Efeito da administração da Riparina III sobre o déficit de memória no teste do Labirinto em Y .....	76
<b>5.4 Efeito da Riparina III sobre a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos expostos a LPS</b> .....	78

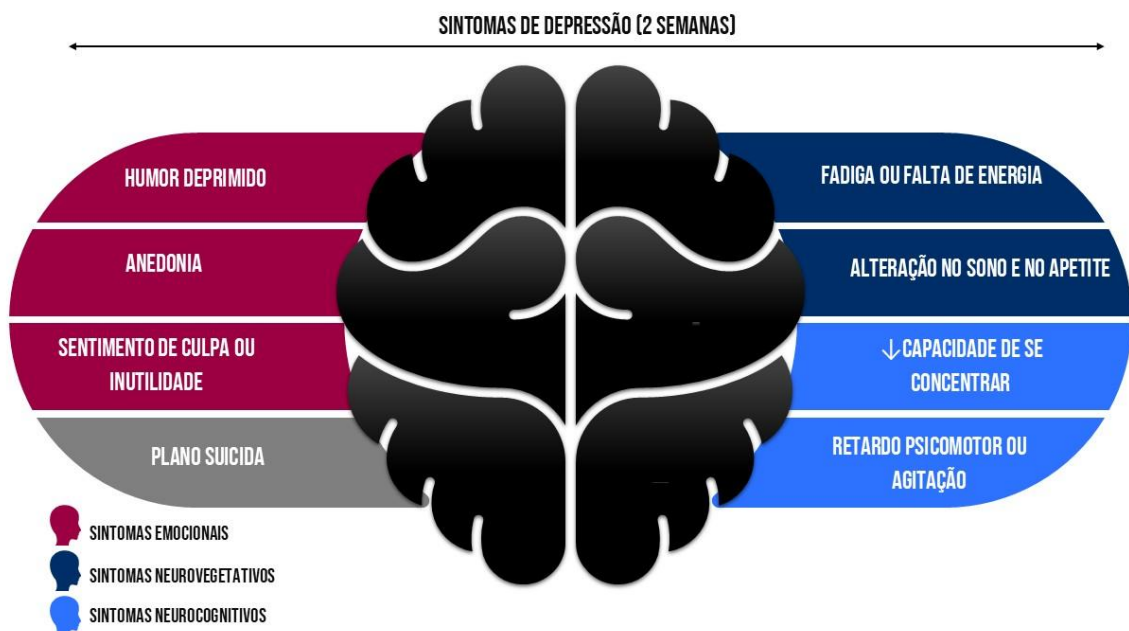
<b>5.5 Efeito da Riparina III sobre a concentração de Glutathione reduzida (GSH) no hipocampo e córtex pré-frontal.....</b>	<b>79</b>
<b>5.6 Efeito da Riparina III sobre a concentração de citocinas: Interleucina 1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>) e Interleucina 6 (IL-6) no hipocampo e córtex pré-frontal .....</b>	<b>80</b>
<b>6 RESULTADOS IN VITRO .....</b>	<b>82</b>
<b>6.1 Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT .....</b>	<b>82</b>
<b>6.2 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial .....</b>	<b>84</b>
<b>6.3 Avaliação dos mecanismos de morte celular por marcação de Iodeto de Propídio (PI) e Anexina V (Anx) diante da ação da Riparina frente a exposição das células PC12 e astrócitos ao LPS.....</b>	<b>85</b>
<b>6.4 Visualização de alterações morfológicas pela MEV induzidas pelo LPS em células PC12 e em astrócitos e os efeitos da Riparina III na reversão .....</b>	<b>88</b>
<b>7 RESULTADOS IN SILICO .....</b>	<b>90</b>
<b>7.1 Docking Molecular .....</b>	<b>90</b>
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>112</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Depressão e seus mecanismos fisiopatológicos

O Transtorno Depressivo Maior (TDM), também conhecido como depressão, é classificado como um grave transtorno de humor e representa um desafio significativo para a saúde mental em escala global, afetando cerca de 280 milhões de pessoas no mundo. Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) e a Classificação Internacional de Doenças (CID), a depressão é caracterizada por uma série de sintomas, como perda de interesse em atividades, humor deprimido, alterações no sono e apetite, sentimento de culpa e inutilidade, dificuldade em tomar decisões, dificuldade de concentração e pensamentos suicidas. O diagnóstico do TDM é baseado na presença de uma síndrome formada por cinco ou mais sintomas (Figura 1), quase todos os dias, durante um período contínuo de duas semanas, causando prejuízo funcional ao indivíduo (HE et al., 2023; MALHI; MANN, 2018; WHO, 2023).

Figura 1 - Sintomas do transtorno depressivo maior



Fonte: Elaborada pela autora

É importante destacar que, na depressão, é comum ocorrer uma diminuição do sono, peso e apetite, embora também possam ocorrer aumentos. Além disso, é

fundamental documentar a presença de ideação, planos ou tentativa de suicídio. Alguns sintomas são mais específicos do transtorno depressivo, como anedonia (diminuição da capacidade de sentir prazer), variação diurna (ou seja, os sintomas depressivos pioram durante certos períodos do dia) e uma intensificação da culpa em relação à própria condição. Por outro lado, outros sintomas, como fadiga, perda de apetite ou peso e insônia, são bastante comuns em outras condições médicas. Quanto maior o número e a gravidade dos sintomas (em oposição a sintomas específicos), maior é a probabilidade de causarem um impacto funcional significativo (MALHI; MANN, 2018).

A prevalência da depressão é considerável, com cerca de 4,4% da população mundial sendo afetada. É importante destacar que muitas pessoas experimentam o início da depressão durante o início da idade adulta, com uma prevalência de 4% a 5% entre os 14 e 25 anos de idade. Este transtorno também tem impactos significativos em áreas como educação, relacionamentos e emprego. Além disso, está associado de forma prospectiva a condições adversas de saúde, como obesidade, doenças cardíacas e aumento do risco de mortalidade prematura, incluindo suicídio (MARWAHA et al., 2023; WHO, 2017).

Globalmente, mais de 10% das gestantes e puérperas sofrem de algum transtorno mental, principalmente a depressão. Além disso, é o principal fator de risco psiquiátrico para o suicídio, o qual é responsável por mais de 700.000 mortes por depressão a cada ano, sendo considerado a quarta principal causa de óbito entre jovens com idades entre 15 e 29 anos, incluindo um risco três vezes maior para depressão em adultos (OMS, 2023; RAO; CHEN, 2009).

Apesar da existência de tratamentos conhecidos e eficazes para transtornos mentais, mais de 75% das pessoas em países de baixa e média renda não têm acesso aos tratamentos convencionais, havendo diversos obstáculos para isso, como a falta de investimentos em saúde mental, a escassez de profissionais de saúde capacitados e o estigma social associado aos transtornos mentais (EVANS-LACKO et al., 2018; WOODY et al., 2017).

Paralelamente, é relevante ressaltar que nos últimos anos, tem havido um aumento nos relatos de problemas de saúde mental entre os sobreviventes da doença do coronavírus (Covid-19) causada pelo vírus SARS-CoV-2. Segundo dados da OMS (2023), mais de 767 milhões de casos foram diagnosticados, resultando em mais de 6 milhões de mortes. Como resultado, transtornos mentais como transtorno

depressivo maior (TDM), transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), transtornos de ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e insônia têm sido frequentemente relatados (KONG ET AL., 2020; MAZZA ET AL., 2020; STEARDO; STEARDO; VERKHRATSKY, 2020).

Sintomas de TDM podem persistir por meses, enquanto dificuldades cognitivas, como déficits de memória episódica, atenção e concentração e funções executivas têm sido observadas mesmo após infecções leves. Dessa forma, a interseção entre a alta prevalência de infecções por COVID-19 e a ocorrência de transtorno depressivo maior entre aqueles afetados pela doença pode resultar em um grave problema global, ampliando significativamente o grupo de pessoas que sofrem com essa condição (LORKIEWICZ; WASZKIEWICZ, 2021; RITCHIE; CHAN, 2021).

Além dos impactos diretos na saúde, a crise da COVID-19, em associação com a depressão, também tem consequências econômicas significativas. Os sintomas prolongados da doença, a incapacidade dos trabalhadores de desempenhar suas funções, o fechamento de empresas e as mortes prematuras resultam em uma crise econômica que afeta diretamente a vida cotidiana da população. Esses fatores, somados, contribuem para a redução da qualidade de vida e intensificam a ansiedade e outros prejuízos psicológicos. Nesse sentido, é de extrema importância buscar diferentes formas de mitigar os efeitos da pandemia, tanto para a saúde mental quanto para o setor econômico (LORKIEWICZ; WASZKIEWICZ, 2021; SUNDARAPPERUMA et al., 2023).

Diante dos dados apresentados, é válido ressaltar que, atualmente, compreendemos a depressão como uma doença multifatorial, resultante de uma interação complexa entre fatores genéticos, estresse e outros processos patológicos, como inflamação. Nesse sentido, vários estudos têm contribuído para o desenvolvimento de diferentes teorias que buscam descrever a sua etiologia. Embora nenhuma dessas hipóteses seja totalmente abrangente, cada uma delas oferece informações valiosas sobre diferentes aspectos do transtorno, e ao considerarmos essas teorias como “peças de um quebra-cabeça maior”, é possível vislumbrar uma imagem mais completa e compreensiva do TDM (FILATOVA; SHADRINA; SLOMINSKY, 2021).

Historicamente, acreditava-se que o TDM era causado por uma deficiência de monoaminas — como serotonina, noradrenalina e dopamina — no sistema nervoso central e, com base nessa hipótese, os medicamentos que aumentam a concentração

dessas substâncias na fenda sináptica foram considerados como potenciais antidepressivos. No entanto, esse modelo passou a ser questionado. Primeiro, porque os fármacos produzem seus efeitos neuroquímicos em poucas horas, mas a melhora clínica dos sintomas geralmente só ocorre após algumas semanas. Segundo, porque mesmo diante de alterações farmacológicas significativas, muitos pacientes não apresentam resposta satisfatória. Esses achados levaram a uma mudança de paradigma: de um modelo centrado apenas no efeito imediato sobre neurotransmissores para uma visão mais abrangente, que considera a ação tardia dos antidepressivos na promoção de neuroplasticidade, corrigindo deficiências em neurônios, processos celulares e sinapses envolvidos na patogênese da depressão (TARTT et al., 2022).

Nesse contexto, Filatova; Shadrina; Slominsky (2021) ressaltam que, embora um extenso número de estudos tenha se dedicado a investigar as causas da depressão no campo da psicologia e da psiquiatria, até o momento, a compreensão dos mecanismos patogénéticos do TDM tem sido amplamente influenciada por estudos fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos. Essas pesquisas proporcionam conhecimentos fundamentais para a formulação de diversas teorias que tentam descrever o desenvolvimento deste transtorno em níveis bioquímicos, celulares, anatômicos e fisiológicos. Entre essas teorias, as mais abordadas incluem: hipótese das monoaminas, já relatada anteriormente; a hipótese da depressão induzida pelo estresse, que enfatiza o impacto do estresse na ocorrência do TDM; hipótese da neuroplasticidade; hipótese da relação entre processos inflamatórios e a depressão ou neuroinflamação.

Embora nenhuma dessas hipóteses seja capaz de fornecer uma explicação completa para a complexidade do transtorno, todas compartilham vias comuns que sugerem sua interconexão e representam diferentes aspectos de um quadro abrangente. Aprofundar nossa compreensão sobre elas é crucial para avançar na melhoria dos tratamentos e intervenções destinados ao TDM. Ao desvendar progressivamente esses mecanismos, podemos oferecer esperança e alívio aos indivíduos que sofrem com essa condição debilitante, abrindo caminho para estratégias terapêuticas mais eficazes e melhorando sua qualidade de vida.

## **1.2 Hipóteses sobre os mecanismos patogênicos da depressão: explorando os caminhos da compreensão**

A heterogeneidade da depressão reflete a complexidade da pesquisa sobre essa condição. Nesse contexto, inicia-se este tópico abrangendo a hipótese da depressão induzida pelo estresse, uma teoria que busca explicar as possíveis causas da depressão que não foram abordadas pela hipótese das monoaminas. Essa hipótese sugere que o estresse crônico e o subsequente mau funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) desempenham um papel importante na patogênese da depressão. No entanto, o impacto do estresse depende de vários fatores, como o tipo de estressor, sua duração, herança genética e histórico de vida (FILATOVA; SHADRINA; SLOMINSKY, 2021).

O eixo HPA exerce um papel central na resposta neuroendócrina ao estresse, uma vez que, quando ocorrem estímulos estressantes, tanto internos quanto externos, os neurônios localizados no núcleo paraventricular hipotalâmico sintetizam o fator liberador de corticotrofina (CRF), o que resulta na liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise. O ACTH, por sua vez, sinaliza o córtex adrenal para a produção e liberação de glicocorticoides (um marcador da desregulação do eixo), como o cortisol, na corrente sanguínea. No cérebro, os glicocorticoides exercem uma variedade de efeitos de curto e longo prazo, incluindo alterações imediatas na atividade neuronal, bem como efeitos crônicos na remodelação dendrítica e na mielinização. Assim, os glicocorticoides desempenham um papel fundamental na resposta ao estresse, afetando o funcionamento do cérebro em diferentes níveis (FREIMER et al., 2022).

Autores também relataram que a exposição excessiva à glicocorticoides leva a atrofia do processo dendrítico e redução da plasticidade sináptica em regiões que expressam uma densidade relativamente alta de receptores de glicocorticoides (GR), incluindo o hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e corpo estriado. Além disso, fatores neuroinflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o inflamassoma contendo o domínio de pirina 3 (NLRP3), a IL-18 e a caspase-1, são considerados mediadores-chave das respostas fisiológicas e psicológicas ao estresse. Dessa forma, o estresse desencadeia a ativação da neuroinflamação, resultando em comportamentos de ansiedade e depressão (FREIMER et al., 2022; RAYMOND et al., 2018; WU et al., 2021). Assim, o

desequilíbrio entre os níveis de glicocorticoides e a resposta neuroinflamatória desempenha um papel importante na manifestação de sintomas de ansiedade e depressão relacionados ao estresse.

Outra hipótese biológica proposta para explicar a depressão é a hipótese da neurotrofina ou neuroplasticidade. Segundo essa teoria, a depressão ocorre devido a um funcionamento anormal da neurogênese nas áreas cerebrais envolvidas na emoção e cognição. De acordo com essa hipótese, a expressão dos fatores de crescimento neuronal, conhecidos como neurotrofinas, é reduzida em resposta a estressores. As neurotrofinas são proteínas que desempenham um papel crucial na sobrevivência, desenvolvimento e diferenciação dos neurônios. A diminuição do suporte neurotrófico relacionada ao estresse leva a uma redução na neurogênese no hipocampo, resultando em atrofia neuronal e perda de células gliais (AROSIO et al., 2021).

Nessa perspectiva, destaca-se um membro crucial da família das neurotrofinas, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que desempenha um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso, apoiando a sobrevivência dos neurônios e facilitando a neurogênese. Como um regulador essencial da plasticidade sináptica, tanto do sistema glutamatérgico quanto do sistema ácido gama-aminobutírico (GABA), o BDNF é amplamente expresso no hipocampo, uma região envolvida na função cognitiva, além do córtex e corpo estriado. Estudos têm investigado como níveis reduzidos dessa neurotrofina não apenas contribuem para o desenvolvimento da depressão, mas também como a própria depressão resulta em níveis diminuídos de BDNF (BUS ET AL., 2015; COLUCCI-D'AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020; LI et al., 2022a; WANG et al., 2022).

Dessa forma, pode-se dizer que esta hipótese é fortemente sustentada pelo significativo papel que a neuroplasticidade estrutural e funcional desempenha no tratamento e prevenção da depressão. Através dela, o cérebro pode reorganizar-se, criando vias neurais para adaptação e melhoria em áreas afetadas. Em outras palavras, quando as conexões neuronais associadas a pensamentos e experiências negativas não são utilizadas, ocorre enfraquecimento, enquanto novas conexões podem ser estabelecidas por meio de comportamentos específicos, especialmente no córtex pré-frontal, hipocampo, centro de recompensa e amígdala, que são áreas relacionadas à depressão. Esses mecanismos explicam a etiologia da depressão e



ansiedade, e apontam caminhos para os processos de tratamento e recuperação (GUNUC; KOYLU, 2023).

Apesar de esta hipótese ter motivado extensas pesquisas, infelizmente, estudos experimentais e ensaios clínicos revelaram achados contraditórios e questionaram a aplicabilidade clínica da quantificação de BDNF em amostras de soro, sangue total ou plasma para o diagnóstico, monitoramento e prognóstico da depressão. Questões importantes ainda permanecem fragmentadas entre estudos experimentais, genéticos, ensaios clínicos e meta-análises, e uma interpretação adequada desses resultados é crucial para evitar ruídos e mal-entendidos relacionados às concentrações periféricas de BDNF no TDM (AROSIO et al., 2021).

É importante ressaltar que a literatura científica relacionada à base biológica da depressão é ampla e abrangente. Neste contexto, buscou-se fornecer uma visão sucinta das principais teorias em estudo. No entanto, uma hipótese que merece destaque é a teoria neuroinflamatória, não apenas devido ao foco desta pesquisa, mas também devido à sua complexidade e às bases que sustentam sua interação com as causas da depressão. Antes disso, é apresentado um esquema imagético resumido das hipóteses abordadas (Figura 2).

Figura 2 - Hipóteses das causas da depressão



Fonte: Elaborada pela autora

### 1.2.1 Hipótese inflamatória da depressão

A inflamação é um processo dinâmico e crucial que desencadeia a primeira resposta protetora do sistema imunológico do organismo. Seu objetivo imediato é

proteger contra invasões microbianas, entrada de antígenos e danos celulares ou teciduais, por meio de interações complexas entre mediadores solúveis, células residentes, células infiltrantes e moléculas da matriz extracelular. Uma resposta inflamatória bem-sucedida e controlada é essencial para a eliminação de estímulos prejudiciais e a restauração da fisiologia normal, sendo regulada por uma complexa cascata molecular. Qualquer falha nessa resposta pode levar a morbidade e redução da expectativa de vida. Sendo assim, a extensão da resposta inflamatória é de extrema importância, uma vez que, se a inflamação aguda não conseguir regular o estímulo pró-inflamatório, isso pode resultar em inflamação crônica, desencadeando processos autoimunes e causando danos excessivos nos tecidos (TASNEEM et al., 2019).

No que diz respeito a esse assunto, é essencial ressaltar que o início da inflamação, como resultado de uma infecção ou lesão, ocorre por meio da ativação de receptores de reconhecimento de patógenos (PRR), tais como os receptores do tipo Toll (TLR). Esse processo desencadeia a síntese de mediadores solúveis, como citocinas pró-inflamatórias. Ao mesmo tempo, ocorre a regulação positiva de moléculas de adesão celular nos leucócitos circulantes e nas células endoteliais, promovendo o influxo de granulócitos e fagócitos mononucleares do sangue. Após sua chegada, os granulócitos, como os neutrófilos, desempenham um papel crucial na fagocitose e eliminação de resíduos celulares e microrganismos por meio de mecanismos intracelulares distintos, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila, e/ou mecanismos extracelulares, através da liberação de “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (NET), constituídas por DNA, histonas e proteínas antimicrobianas que se projetam para fora da célula e aprisionam os patógenos, ajudando assim a combater as infecções (FEEHAN; GILROY, 2019).

A ativação dos PRR ocorre ao reconhecerem padrões moleculares associados a danos (DAMP) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Estes primeiros são conhecidos como alarminas, e são moléculas hospedeiras que sinalizam a ocorrência de danos celulares, como proteínas de choque térmico. Por outro lado, os PAMP são encontrados em patógenos infecciosos. Esse processo é dado na vigilância contínua da circulação mediada pelo sistema imune inato, a primeira linha de defesa do organismo, que é composta por células mieloides imunes

inatas (macrófagos/monócitos, células dendríticas) e células linfoides, as quais possuem tais receptores (GONG et al., 2020).

Nesse ambiente, como parte da resposta imunológica, os neutrófilos realizam a fagocitose de patógenos e células infectadas, destruindo-os por meio da liberação de produtos químicos tóxicos, como proteinases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, eles liberam compostos antimicrobianos no plasma e secretam citocinas que amplificam ainda mais a resposta inflamatória, além da ativação do sistema complemento, uma série de proteínas de fase aguda que combatem patógenos, criando poros em suas membranas, aumentando a permeabilidade vascular e desempenhando outras funções de suporte. Essa fase inicial da inflamação pode causar danos significativos aos tecidos circundantes devido a uma resposta relativamente indiscriminada. O objetivo é eliminar ou isolar rapidamente a fonte da ameaça, embora isso aconteça com um custo considerável de automutilação. Na fase de resolução, os neutrófilos são substituídos por monócitos e macrófagos, iniciando o processo de cicatrização de feridas e, finalmente, restaurando a homeostase no local afetado (DEL GIUDICE; GANGESTAD, 2018).

As citocinas, por outro lado, são pequenas proteínas com impacto significativo nas funções e interações celulares, podendo exercer efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios. Elas são predominantemente produzidas por células imunes, incluindo a micróglia no sistema nervoso central (SNC), desempenhando funções cruciais como a manutenção da neuroplasticidade. Além disso, outras células do SNC, como neurônios e astrócitos, também podem produzi-las. Assim, no campo da psiconeuroimunologia, algumas citocinas têm sido amplamente estudadas, entre elas a interleucina (IL)-6, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interferons (IFN) no contexto inflamatório, e a Interleucina 10 (IL-10) no contexto resolutivo (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020).

É crucial enfatizar que, apesar das funções importantes das citocinas no sistema nervoso central (SNC), seu excesso ou atividade prolongada pode perturbar diversas funções neuronais, incluindo a sinalização de neurotransmissores e a regulação da síntese, recaptação e liberação de neurotransmissores. Esse desequilíbrio tem impacto nas funções relacionadas ao humor e à cognição. Mecanismos relevantes que podem levar ao aumento da atividade de citocinas no cérebro até níveis patológicos estão relacionados a estressores físicos e psicológicos (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020).

Nesse cenário, Del Giudice; Gangestad (2018) destacam que as condições inflamatórias crônicas estão associadas à exposição a estressores, como estresse psicossocial, eventos traumáticos de vida e adversidades na infância. Esses fatores têm recebido destaque na literatura psicológica e comportamental, pois estão relacionados a transtornos mentais, como a depressão. Em muitos casos, a presença dessa inflamação é inferida por meio de elevações moderadas de IL-6 e proteína C-reativa (PCR), embora outras citocinas (como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) também sejam ocasionalmente avaliadas. Portanto, a inflamação crônica é de grande interesse para os cientistas comportamentais, devido aos danos que ela pode causar e que ameaçam a saúde da pessoa a longo prazo.

Por mais de três décadas, pesquisadores têm se dedicado ao estudo da relação entre sintomas depressivos e estados inflamatórios. Esse interesse teve origem a partir da observação de que a administração crônica de interferon (IFN)- $\alpha$  – uma citocina pró-inflamatória utilizada no tratamento de hepatite C e algumas doenças malignas – resultou em sintomas depressivos que responderam aos tratamentos antidepressivos convencionais, o que reforçou a ideia de que havia uma ligação entre inflamação e depressão (RENAULT et al., 1987). Introduzido inicialmente por Dantzer et al. (2013), o conceito de 'comportamento de doença' estabelece uma conexão entre inflamação e depressão, sugerindo que a ativação contínua do sistema imunológico periférico leva à circulação de citocinas pró-inflamatórias, as quais aumentam a sinalização imune no cérebro e, conseqüentemente, agravam o comportamento relacionado à doença, predispondo uma pessoa à depressão (DANTZER et al., 2008; JOHNSTON et al., 2023; ZUNSZAIN; HEPGUL; PARIANTE, 2013).

Esse campo de estudo tem sido alvo de constante investigação, visto que a compreensão dessa interação entre inflamação e depressão pode ter implicações significativas no desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes para o tratamento dos transtornos mentais associados à inflamação crônica.

Nessa perspectiva, Serafini et al. (2023) apresentam algumas considerações baseadas em pesquisas anteriores sobre o papel da inflamação na fisiopatologia da depressão. Primeiramente, observou-se que pacientes com doenças somáticas inflamatórias têm maior propensão a desenvolver depressão (BOUÇAS; RHEINHEIMER; LAGOPOULOS, 2022; BRUNDIN et al., 2016). Em segundo lugar, foram realizados estudos de associação genômica para identificar genes candidatos relacionados à vulnerabilidade à depressão. De maneira notável, foram identificadas

várias redes genéticas de inflamação, sendo variantes em citocinas e mediadores inflamatórios os achados mais consistentes e replicáveis (BARNES; MONDELLI; PARIANTE, 2017; JABBI et al., 2020; PANTAZATOS et al., 2017).

De fato, como traz Johnston et al. (2023) em seu estudo, novas evidências provenientes de estudos populacionais reforçam a ideia de que a inflamação crônica de baixo grau – embora não seja uma constante em todos os indivíduos com depressão – pode desempenhar um papel fundamental na fisiopatologia da depressão em um grupo específico de pacientes.

Dados obtidos de estudos longitudinais apontam que a perturbação da resposta inflamatória está associada a um curso mais grave da doença, maior recorrência de sintomas depressivos e resultados adversos, incluindo alterações na conectividade cerebral nos circuitos de motivação e recompensa, aumento das tendências suicidas, e, especialmente, maior resistência às abordagens terapêuticas convencionais. Além disso, os circuitos de recompensa também podem impactar um sintoma característico da depressão resistente ao tratamento: anedonia, que também tem sido consistentemente relacionada à inflamação (ARTEAGA-HENRÍQUEZ et al., 2019; KELLY; FREEMAN; SCHUMACHER, 2022; LEONARD, 2018).

Nessa perspectiva, a exploração dos efeitos da inflamação nos circuitos cerebrais relacionados ao controle do humor tem proporcionado compreensões sobre os mecanismos subjacentes à resistência aos antidepressivos convencionais e tem motivado a realização de ensaios clínicos que utilizam abordagens anti-inflamatórias para tratar grupos específicos de pacientes com depressão. Além disso, estudos em animais revelaram que infecções provocam um "comportamento doentio" caracterizado por letargia, anorexia, anedonia e comportamento depressivo, sendo essa resposta associada a níveis elevados de citocinas circulantes. Embora a complexidade da depressão seja difícil de replicar completamente em roedores, esses modelos têm contribuído para o entendimento do papel das moléculas pró-inflamatórias na depressão (LYRA e SILVA et al., 2022).

Adicionalmente, os estudos pré-clínicos têm sido esclarecedores ao revelar que a ativação do sistema imunológico periférico através da administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina, desencadeia consistentemente comportamentos "depressivos" em roedores (JOHNSTON et al., 2023). Essas descobertas ressaltam a estreita ligação entre a inflamação e o desenvolvimento de sintomas depressivos, fornecendo informações valiosas para o entendimento dos

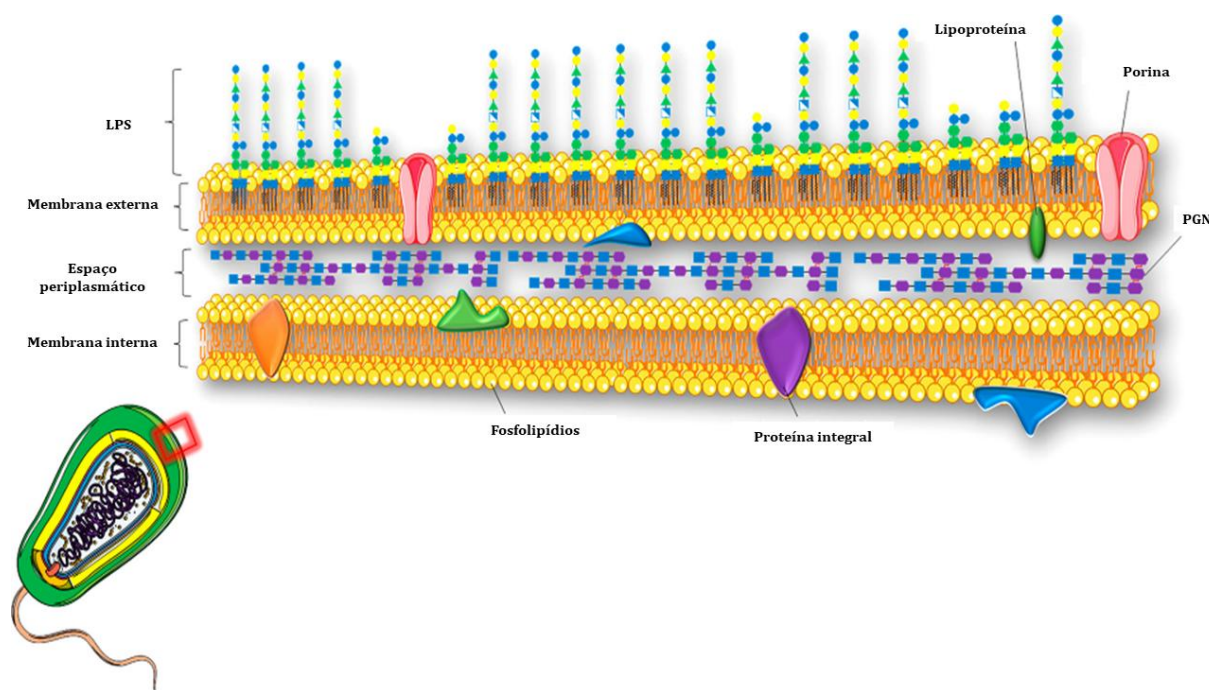
mecanismos subjacentes. Assim, a exploração do modelo de depressão por inflamação com o uso de LPS pode abrir novas perspectivas terapêuticas no tratamento da depressão, com vistas na inovação e eficácia. Com isso, é imprescindível abordar com maior profundidade a respeito dessa endotoxina, que tem sido objeto de considerável interesse nos estudos recentes.

#### *1.2.1.1 Lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli: Implicações na Depressão*

Inicialmente, é relevante ressaltar que os carboidratos constituem uma classe de moléculas orgânicas amplamente disseminadas na natureza, as quais desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos, incluindo a resposta imune e interações entre patógenos e hospedeiros. Os glicanos, biomoléculas que fazem parte dos carboidratos, podem se ligar a proteínas formando glicoproteínas ou proteoglicanos, bem como a lipídios (glicolipídios) ou existir como polímeros livres. Assim, não apenas a sua diversidade estrutural, mas também a conformação espacial do polissacarídeo em seu contexto celular, desempenha um papel crucial em sua função. Portanto, o conhecimento da estrutura tridimensional e das preferências conformacionais em seu ambiente é fundamental para compreender seus papéis em nível molecular (PATEL et al., 2020; VARKI, 2017).

Por meio do componente glicolipídio, a molécula de lipopolissacarídeo (LPS) se ancora ao folheto externo da membrana externa da bicamada das bactérias Gram-negativas (Figura 3), conferindo-lhe uma natureza anfifílica. Enquanto o folheto interno é composto por glicerofosfolipídios e apresenta simetria, sendo um sistema flexível e fluido, a membrana externa é assimétrica, contendo o LPS, que possui uma estrutura semirrígida e altamente ordenada devido à sua âncora glicolipídica. Essa porção está covalentemente ligada a uma parte de sacarídeo, junto com resíduos de ácidos graxos densamente empacotados na âncora lipídica, além de fortes interações eletrostáticas. Além disso, a presença de grupos fosfatos negativamente carregados, que são neutralizados por cátions divalentes intercalados entre as moléculas de LPS, resulta em interações iônicas que aumentam significativamente o seu empacotamento, e conseqüentemente, reforçam sua função de barreira na membrana externa (DI LORENZO et al., 2022).

Figura 3 - Visão da estrutura esquemática das bactérias Gram-negativa



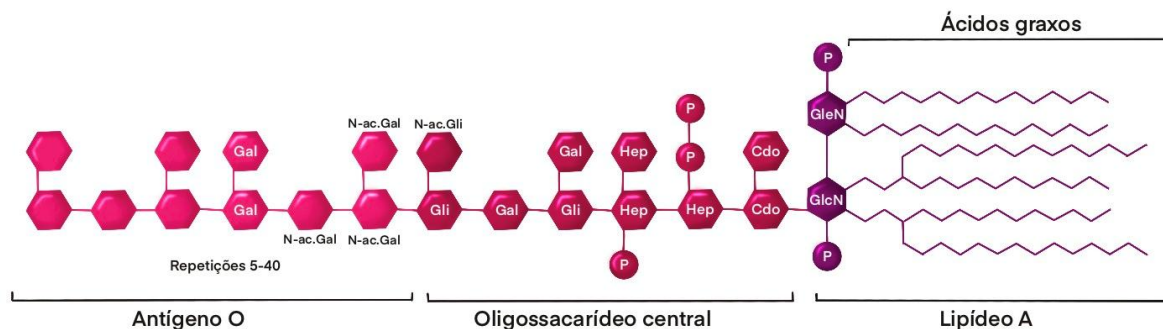
Fonte: Adaptado de Di Lorenzo et al. (2022), pág. 15769

Legenda: LPS: lipopolissacarídeos; PGN: peptidoglicano

As estruturas esquematizadas são imaginárias e não desenhadas em escala.

A molécula de LPS é composta por três domínios: uma porção conservada de lipídio-carboidrato denominada lipídio A, que está ancorada na membrana bacteriana externa; o oligossacarídeo central, que está covalentemente ligada ao lipídio A e pode ser dividida em núcleos externo e interno; uma região de polissacarídeo de antígeno O, que está ligada ao núcleo externo (Figura 4). As cargas negativas que conferem a estabilização da estrutura estão presentes no oligossacarídeo central e no lipídio A. Os antígenos O são construídos a partir de oligossacarídeos de 1 a 8 açúcares. Como principal componente da membrana externa em bactérias gram-negativas, o LPS desempenha um papel fundamental nas interações das bactérias com o ambiente, desde a ligação a materiais inorgânicos até a agregação com outras células (PATEL et al., 2020; SCHUTTER et al., 2023; STÄHLE; WIDMALM, 2019).

Figura 4- Estrutura do LPS



Fonte: Adaptação realizada por Stéphanie Balestro através do software Procreate® para iPad.

Legenda: *Gal*: galactose; *N-ac.Gal*: N-acetil-galactosamina; *N-ac.Gli*: N-acetil-glicosamina; *Gli*: glicose; *Hep*: L-glicerol-D-mano-heptose; *Cdo*: ácido 2-ceto-3-desoxioctônico; *GlcN*: glucosamina; *P*: fosforo.

O LPS é classificado como um PAMP e pode ativar a resposta imune inata após seu reconhecimento por PRR. Em mamíferos, essa endotoxina desencadeia a ativação do receptor *Toll-like4* (TLR4), a partir do seu centro da imunoatividade contida na porção lipídica A. A estimulação do TLR4 leva à ativação de vias de sinalização à jusante, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e o fator nuclear kB (NF-kB). Através dessa via, ocorre um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando à produção excessiva de óxido nítrico (NO) e contribuindo para a inflamação exacerbada (CUI et al., 2024; SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SAŁAT, 2022).

Além disso, o LPS aumenta a expressão de citocinas inflamatórias, ativando as Janus quinases (JAK) associadas a receptores, que, por sua vez, levam à fosforilação dos fatores de transcrição STAT. Os STAT ativados formam dímeros, que se translocam para o núcleo e atuam como fatores de transcrição para regular a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, tornando a via de sinalização JAK-STAT um importante mediador da resposta imune inflamatória (BANERJEE et al., 2017; HAN et al., 2021; LEE et al., 2023; YAMAMOTO et al., 2023).

É importante lembrar de acordo com Pallach et al. (2018), que a ativação da resposta imune pelo LPS é benéfica para o hospedeiro, pois aumenta a resistência contra patógenos invasores. No entanto, uma ativação excessiva da sinalização do receptor TLR4 por LPS agonístico pode levar a uma liberação massiva e descontrolada de citocinas, resultando em choque séptico e falência de múltiplos órgãos.



Um ponto interessante destacado por Di Lorenzo et al (2022) é que o estudo do LPS tem intrigado os pesquisadores há séculos, e o interesse em suas múltiplas interações com o hospedeiro e o ambiente continua a crescer. Inicialmente, o LPS chamou a atenção devido à sua capacidade de estimular o sistema imunológico como um PAMP. No entanto, é uma molécula de comportamento complexo, atuando em várias frentes. Se por um lado, é fundamental para a integridade e estabilidade da membrana celular bacteriana Gram-negativa, fornecendo resistência a estresses externos, por outro lado, sua forma "tóxica" pode levar a resultados graves, como o choque séptico, como mencionado. Ao mesmo tempo, é essencial para o desenvolvimento adequado do sistema imunológico do hospedeiro e a detecção de microrganismos perigosos. Apesar de sua importância, ainda há lacunas de conhecimento a serem preenchidas. A compreensão completa de como um determinado LPS interage com o hospedeiro e sua importância em diferentes contextos ainda é um tema de debate em diversas áreas de pesquisa.

Como objeto de extensa pesquisa nos últimos anos, a hipótese neuroinflamatória ganhou força recentemente porque algumas doenças inflamatórias são acompanhadas por depressão, e as citocinas inflamatórias produzidas em resposta ao LPS podem atravessar a barreira hematoencefálica e interagir diretamente com neurônios e outras células do sistema nervoso central, levando a alterações nos circuitos cerebrais envolvidos no controle do humor e do comportamento, especialmente aumentando o estresse oxidativo no hipocampo e córtex pré-frontal (ZENG et al., 2023).

Dessa forma, o modelo de indução de comportamento do tipo depressivo por LPS tem sido amplamente adotado e considerado relevante na pesquisa de novos antidepressivos, uma vez que revela significativas mudanças neuroquímicas e estruturais nas áreas cerebrais envolvidas na regulação do humor (CASARIL et al., 2017; CORDEIRO et al., 2019). Este modelo, pioneiramente proposto por Yirmiya em 1996, observou que ratos submetidos a injeções intraperitoneais de LPS manifestaram sintomas de anedonia, redução no consumo de alimentos, perda de peso, diminuição da atividade locomotora e interação social reduzida. No entanto, ao administrar antidepressivos cronicamente, esses comportamentos foram revertidos. Além disso, a administração de LPS aumenta os níveis de corticosterona, indicando que a injeção de LPS pode induzir atividade no eixo HPA (SUN et al., 2023; YIRMIYA, 1996).

Estudos têm demonstrado que a administração sistêmica de LPS resulta em comportamento semelhante à depressão em camundongos, observado nos testes de nado forçado e suspensão da cauda. Além disso, ativa o receptor TLR4 presente nas células da micróglia, que, por sua vez, pode desencadear a ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B, que migra para o núcleo celular e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, associada ao aumento do estresse oxidativo no hipocampo de camundongos, o que pode contribuir ainda mais para o desenvolvimento do comportamento depressivo. Dessa forma, a investigação de estratégias capazes de atenuar as respostas inflamatórias e o estresse oxidativo induzidos pelo LPS não apenas amplia a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da depressão, como também pode contribuir para a identificação de potenciais alvos terapêuticos (AHL et al., 2023; ARIOZ et al., 2019; BHATT; NAGAPPA; PATIL, 2020; DOS SANTOS et al., 2023b; SPOHR et al., 2022).

Apesar de fornecerem dados relevantes, é importante salientar que os modelos animais nem sempre satisfazem todos os critérios de validação (como construção ideal, face e validade preditiva) para transtornos mentais, além de apresentarem altos custos de tempo e recursos financeiros. Devido a essas limitações, muitos pesquisadores têm se voltado para modelos *in vitro* de depressão, que oferecem mecanismos mais claros, maior velocidade e economia de recursos, tornando-os ideais para triagem em larga escala de drogas antidepressivas. Nesse sentido, algumas células utilizadas para estudos de depressão e triagem de antidepressivos incluem células-tronco neurais, células da microglia, células da astroglia, células de glioma C6, células de neuroblastoma SH-SY5Y, células de feocromocitoma (PC12), entre outras (TIAN et al., 2018).

Nesse contexto, a combinação de estudos em animais e células, com destaque para astrócitos e células PC12, foco desse estudo, desempenha um papel essencial na obtenção de uma compreensão mais abrangente dos mecanismos da neuroinflamação induzida por LPS e sua relação com a depressão. Os modelos *in vitro*, a partir das células mencionados, complementam os estudos *in vivo*, permitindo investigações detalhadas dos eventos moleculares e celulares envolvidos na resposta inflamatória cerebral. Essa abordagem proporciona informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo a depressão.

### 1.3 Astrócitos e PC12 no Sistema Nervoso Central

Os astrócitos são células altamente versáteis encontradas no sistema nervoso central (SNC), desempenhando uma série de funções vitais para a manutenção fisiológica desse órgão. Eles estão envolvidos na homeostase dos neurotransmissores, atuando como uma barreira hematoencefálica, e participam da remodelação neural. Além disso, os astrócitos fornecem metabólitos energéticos, fatores tróficos e antioxidantes, incluindo a glutatona reduzida (GSH), aos neurônios. Além de suas funções metabólicas, os astrócitos também desempenham papéis imunológicos, podendo induzir respostas inflamatórias quando expostos a moléculas de dano e patógenos (BOBERMIN et al., 2022; GONÇALVES et al., 2019).

Dentro do contexto em que os astrócitos expressam o receptor TLR4, eles podem ser ativados pelo LPS, o que resulta na ativação do NFκB e subsequente produção de várias citocinas pró-inflamatórias. Consequentemente, essas células adquirem um perfil pró-inflamatório caracterizado pelo aumento da expressão e/ou liberação de mediadores inflamatórios, como o TNF-α, interleucinas 1β e IL-6, além da subunidade NFκB p65 e da ciclooxygenase 2 (COX-2) (BOBERMIN et al., 2022).

De acordo com Tang et al. (2021), os astrócitos desempenham um papel fundamental na neuroinflamação, pois, quando ativados, liberam diversas citocinas e mediadores inflamatórios que afetam várias células próximas. Além disso, eles podem facilitar a entrada de leucócitos e auxiliar no recrutamento dessas células inflamatórias para o tecido cerebral, o que amplifica ainda mais a reação inflamatória no SNC. Devido às diversas maneiras pelas quais os astrócitos interagem com outras células inflamatórias, existe um interesse crescente em compreender sua influência na inflamação associada a diferentes distúrbios do sistema nervoso central.

Durante o processo de neuroinflamação e em resposta a estímulos nocivos, os astrócitos desempenham um papel crucial como reguladores das respostas inflamatórias. Eles têm a capacidade de produzir diversos fatores moleculares que podem tanto promover quanto restringir a inflamação, dependendo das condições específicas. Estudos em modelos animais têm demonstrado que a barreira hematoencefálica é comprometida precocemente em distúrbios neurodegenerativos, o que permite a entrada de neurotoxinas provenientes do sangue (YUE et al., 2022).

Além dos astrócitos, a linhagem celular PC12, derivada de feocromocitoma de ratos, é amplamente utilizada em estudos relacionados a doenças neurológicas. Ela

é especialmente empregada para investigar aspectos como sobrevivência, proliferação, diferenciação e apoptose neuronal. Essas células apresentam características semelhantes aos neurônios e, portanto, representam uma base promissora para a pesquisa e tratamento de diversas doenças associadas à neuroinflamação (ZHAO et al., 2023).

As células PC12 já foram empregadas em modelos experimentais *in vitro* de depressão, especialmente através da administração de altas concentrações de corticosterona, que pode induzir dano neuronal e apoptose. Estudos utilizando tratamentos com antidepressivos e extratos mostraram que essas células podem ser protegidas contra esses danos, o que ressalta a viabilidade e relevância dessas células como um modelo para a investigação da depressão (JIANG et al., 2015; TIAN et al., 2018; WANG et al., 2013).

Diante das evidências promissoras obtidas acerca da hipótese da neuroinflamação, e da utilização dos modelos *in vivo* e *in vitro* no estudo da depressão, é essencial considerar a utilização de substâncias naturais como potenciais candidatas para avaliar esses parâmetros em modelos experimentais. As substâncias naturais, como extratos de plantas medicinais e compostos bioativos, têm sido objeto de interesse crescente na pesquisa científica devido às suas propriedades terapêuticas e à presença de compostos com potencial neuroprotetor.

Essas substâncias podem oferecer uma abordagem alternativa e promissora para o tratamento da depressão, além de fornecer insights valiosos sobre os mecanismos envolvidos na neuroinflamação e neuroproteção. A abordagem combinada de estudos em animais e células e a utilização de substâncias naturais pode enriquecer o campo da pesquisa sobre a depressão e abrir novas perspectivas para a descoberta de terapias mais eficazes e seguras para essa condição neuropsiquiátrica complexa.

#### **1.4 Características e propriedades das riparinas**

O uso de produtos naturais tem se destacado como uma alternativa mais segura à farmacoterapia convencional, reduzindo o risco de efeitos adversos ou abstinência. Nas últimas décadas, houve um significativo aumento na utilização de substâncias naturais para tratar diversas doenças, incluindo depressão e ansiedade. Pesquisadores têm dedicado esforços consideráveis para descobrir moléculas

provenientes de fontes naturais, especialmente plantas, que possam contribuir na prevenção desses graves transtornos mentais. Os produtos naturais representam uma fonte valiosa de pequenas moléculas com potencial terapêutico para uma ampla gama de condições humanas, incluindo transtornos de ansiedade e depressão. Essas substâncias têm sido consideradas uma das abordagens mais promissoras no desenvolvimento de tratamentos e oferecem uma importante fonte de novos candidatos a fármacos, representando uma esperança para pacientes que não respondem aos tratamentos convencionais (KHAN et al., 2022).

Ao longo da história, os produtos naturais têm sido empregados para tratar diversas condições de saúde, e evidências indicam seu potencial terapêutico. Diversas plantas contêm metabólitos bioativos que têm sido utilizados de forma eficaz para tratar inflamações, distúrbios neurodegenerativos e complicações correlatas. Os alcaloides, por exemplo, são uma categoria de metabólitos secundários com estrutura contendo nitrogênio, que fazem parte da defesa química das plantas e apresentam fortes efeitos farmacológicos, sendo responsáveis por cerca de 60% das drogas derivadas de fontes vegetais (ARYAL et al., 2022; LU et al., 2022).

Os alcaloides foram identificados como possuidores de atividades anti-inflamatórias, exercendo efeitos de supressão sobre diversos complexos proteicos pró-inflamatórios envolvidos nas vias de sinalização inflamatórias, como o NF- $\kappa$ B, a proteína quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2), a Akt e o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), bem como mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), o NO e diversas citocinas e quimiocinas. Além disso, estudos revelaram que esses alcaloides também demonstram melhora na fisiopatologia de várias doenças do sistema nervoso, como a doença de Parkinson, atuando como inibidores da monoamina oxidase (MAO), da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase, além de agirem como antagonistas do N-metil-D-aspartato (NMDA) e agonistas dos receptores muscarínicos e de adenosina (HUSSAIN et al., 2018; YATOO et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

As pesquisas realizadas por Kooshki et al. (2023) apresentam evidências promissoras sobre o potencial terapêutico dos alcaloides no tratamento de doenças neurodegenerativas. Os alcaloides têm se mostrado candidatos naturais com atividades farmacológicas diversas, abrangendo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neurotróficos. Essas substâncias têm a capacidade de prevenir o declínio cognitivo, alterações comportamentais e morte celular, além de melhorarem

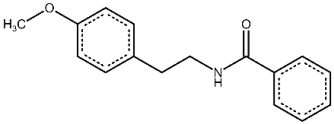
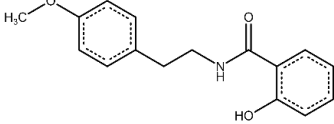
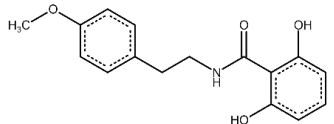
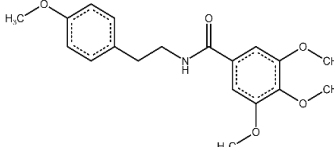
déficits cognitivos, comprometimento da memória, sobrevivência neuronal e autofagia. Além dessas ações, os alcaloides também demonstram a capacidade de modular o efeito da acetilcolinesterase, reduzir a neuroinflamação, inibir a desmielinização e a peroxidação lipídica, e influenciar o fluxo de canais de sódio e cálcio. Outro aspecto relevante é a atenuação significativa da apoptose e do estresse oxidativo, abrangendo múltiplos mecanismos moleculares e vias de sinalização, como as já mencionadas, bem como a interação com fatores de crescimento nervoso (NGF), BDNF e fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta do monofosfato cíclico de adenosina (CREB).

Fazendo parte de uma classe “especial” de alcaloides, tem-se as alcanidas, caracterizadas por conterem um grupo funcional amida e serem encontradas em quantidades limitadas na natureza. Elas são formadas a partir da condensação de um ácido graxo insaturado com uma amina, dando origem à estrutura única da alcanida. Durante o processo de extração e purificação, foram obtidas e isoladas três alcanidas naturais a partir da planta *Aniba riparia* (Nees) Mez., que posteriormente foram sintetizadas em laboratório e denominadas riparinas I, II e III, em homenagem à espécie vegetal (CATÃO et al., 2005; HOFER et al., 1986; M. BARBOSA-FILHO et al., 1987).

A *Aniba riparia* (Nees) Mez, pertencente à família Lauraceae, é uma planta de importância medicinal bem conhecida no Brasil, onde é popularmente chamada de "louro", "louro-casca-fina", "louro-falso-aritu" e "canela de barranco". Essa espécie é amplamente encontrada na região amazônica e pode ser encontrada na Guiana, estendendo-se pelas Cordilheiras dos Andes e pelas montanhas do norte da Venezuela, além de áreas no leste e sul do Brasil. Além de seu uso como tempero, a planta tem sido objeto de estudo devido ao seu potencial medicinal (CAMARGO et al., 2018; SANTOS et al., 2020).

É relevante enfatizar que as três riparinas identificadas - I a III - apresentam variações resultantes da substituição de hidrogênios no anel aromático por uma ou duas hidroxilas nas riparinas II e III, respectivamente. Notavelmente, a riparina III é o principal componente molecular extraído da *A. riparia* (Nees) Mez., correspondendo a 34% do total de compostos obtidos. Além disso, posteriormente, foram sintetizados análogos, tais como a riparina IV (Tabela 1) (BARBOSA et al., 2022; BARBOSA-FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990; M. BARBOSA-FILHO et al., 1987).

Tabela 1 - Nomenclatura IUPAC e estrutura 2D das Riparinas

<p>Riparina I</p> <p>N-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]benzamide</p> 	<p>Riparina II</p> <p>2-Hydroxy-N-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]benzamide</p> 
<p>Riparina III</p> <p>2,6-Dihydroxy-N-(2-(4-methoxyphenyl)ethyl)benzamide</p> 	<p>Riparina IV</p> <p>3,4,5-Trimethoxy-N-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]benzamide</p> 

Fonte: Elaborada pela autora

Conforme destacado por Chaves et al. (2019), uma abordagem promissora reside na utilização de estratégias para explorar a diversidade molecular dos produtos naturais, com o objetivo de conceber coleções de síntese combinatória. Ao realizar modificações estruturais nos esqueletos de produtos naturais bioativos existentes, busca-se aprimorar suas atividades biológicas inatas ou propriedades farmacológicas de forma custo-efetiva. Esse aperfeiçoamento pode ser alcançado tanto por meio de modificações semi-sintéticas da molécula como por métodos sintéticos avançados.

Nesse cenário, o potencial farmacológico das riparinas naturais despertou o interesse de estudiosos em produzir e analisar seus derivados sintéticos, o qual possibilitou a implementação de estudos inovadores em química medicinal e permitiu garantir a sustentabilidade da espécie *A. riparia*.

Assim, a literatura científica sobre a *A. riparia* aborda principalmente as diversas atividades biológicas de suas moléculas de riparina, englobando uma variedade de efeitos benéficos. Essas atividades incluem propriedades ansiolíticas (ARAÚJO et al., 2018; SARTORI et al., 2020), antidepressivas (CHAVES et al., 2019; DE SOUSA et al., 2012; LOPES et al., 2018; MALLMANN et al., 2021; MELO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2022; SOUSA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015), antinociceptivas (CARVALHO et al., 2018), miorelaxantes (GARCIA et al., 2016), antioxidantes (NUNES et al., 2015), antiparasitárias, imunomoduladoras (COSTA et

al., 2021), antitumorais (ARAÚJO et al., 2016), anti-inflamatórias (NASCIMENTO et al., 2016), atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e antifúngica (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2020), e efeito contra lesão gástrica (VALE et al., 2023).

Com base nas diversas atividades já relatadas, é promissor seguir com a investigação dos efeitos da Riparina III no tratamento da depressão, considerando sua eficácia comprovada em outros modelos de doenças neurodegenerativas. Ademais, de acordo com as pesquisas de Vale (2023), a estrutura plana da Riparina III, sua deslocalização extensa de elétrons e a presença da hidroxila apontam para características distintas que podem desempenhar um papel fundamental no seu modo de ação farmacológica. Tais características tornam a Riparina III uma molécula promissora e relevante para pesquisas futuras visando o desenvolvimento de novas terapias para a depressão e outras condições neurológicas.

#### **1.4.1 Riparina III: uma abordagem promissora na neuroinflamação induzida por LPS**

A Riparina III (Rip III), também conhecida como N-(2,6-di-hidroxibenzoil) tiramina, é uma alcalamida natural, representando uma classe de alcaloides com uma função amida que ocorre em poucos compostos naturais. Inicialmente isolada do fruto verde de *Aniba riparia* e posteriormente sintetizada por Barbosa-Filho, Silva e Bhattacharyya em 1990, essa substância é reconhecida como um composto bioativo (Figura 5). A Riparina III é formada a partir da combinação da tiramina com o ácido benzoico e apresenta duas substituições no anel do ácido benzoico, conferindo duas hidroxilas adicionais. Além disso, possui um grupo metil ligado ao oxigênio no anel da tiramina, formando uma função éter.



Figura 5 - Da planta à substância sintética



Fonte: Elaborada pela autora

Apesar de haver poucos estudos com a Riparina III, algumas propriedades farmacológicas já foram demonstradas, incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de efeitos hipotensor e bradicárdico transitório (CATÃO et al., 2005). Além disso, estudos pré-clínicos realizados no Laboratório de Neuropsicofarmacologia (LNF) identificaram efeitos a nível de sistema nervoso central, com atividade ansiolítica, antidepressiva, efeito sedativo-hipnótico e efeito anticonvulsivante (DE SOUSA et al., 2012; MALLMANN et al., 2021; MELO et al., 2013; OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2020; SANTOS et al., 2020; SOUSA et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2015).

No estudo conduzido por Oliveira Júnior e sua equipe (2020) *in vitro*, constatou-se que, dentre as riparinas I, II e III, apenas a riparina III demonstrou atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas padrão e isolados clínicos de multidrogas resistentes de *S. aureus* e *A. baumannii*. Além disso, foram observados altos potenciais de inibição da formação de biofilme, baixa toxicidade e percentual hemolítico. A Riparina III também induziu diversas alterações ultraestruturais nas espécies bacterianas, incluindo rompimento da parede celular, perda de material citoplasmático e mudanças na morfologia bacteriana.

No mesmo período, em um estudo realizado por Santos et al. (2020), o efeito psicofarmacológico da Riparina III foi investigado utilizando testes comportamentais e a análise do perfil metabólico da urina de ratos, realizado pela combinação de análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$ NMR) com análise multivariada de dados, que permite identificar biomarcadores, como cortisol, creatinina, alantoína e triptofano, que se mostraram uma ferramenta diagnóstica importante para comprovar o efeito ansiolítico da Riparina III de maneira mais eficaz e prática. Neste estudo, foi evidenciado o efeito ansiolítico da Riparina III, possivelmente devido à ativação dos receptores 5-HT  $2A$ , o que foi confirmado por meio dos testes comportamentais realizados.

Recentemente, Vale et al. (2023) publicaram um estudo que enfatiza o efeito positivo da Riparina III na lesão gástrica induzida por etanol. Nesse estudo, foi observada uma redução do infiltrado inflamatório e do número de mastócitos, juntamente com a reversão de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, evidenciando o potencial antioxidante da substância. O efeito gastroprotetor sugeriu que os canais de potássio sensíveis a ATP e o óxido nítrico podem estar envolvidos nos efeitos observados pela Rip III no estudo.

Foi constatado que a combinação sinérgica de Riparina III/colistina apresenta grande promessa como uma abordagem terapêutica inovadora para tratar infecções causadas pela bactéria multirresistente *Acinetobacter baumannii*, uma espécie Gram-negativa. Essa combinação tem se mostrado eficaz na inibição e erradicação do biofilme formado por essas bactérias. Além disso, a Riparina III também demonstrou uma atividade antifúngica promissora contra biofilmes de dermatófitos, inibindo a secreção de sulfito, um importante fator de virulência, e prevenindo a formação e viabilidade do biofilme tanto *in vitro* como em amostras *ex vivo* (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2020; SILVA et al., 2023).

Com base nas evidências apresentadas, fica evidente que a crescente exploração do potencial biológico de compostos derivados de plantas tem estimulado investigações farmacológicas com atividades multifuncionais de interesse medicinal, incentivando o desenvolvimento de fármacos com ação em diversos alvos biológicos. Por exemplo, a RIP III tem sido objeto de estudo devido às suas diversas atividades farmacológicas, incluindo potencial ansiolítico, antidepressivo e anti-inflamatório. No entanto, até o momento, não há relatos de estudos biológicos dessa substância na neuroinflamação induzida por LPS, o que torna necessário explorar seu papel nesse

modelo, investigando sua possível atividade antidepressiva e seus mecanismos de ação por meio de modelos *in vivo* e *in vitro* para uma abordagem complementar. Além disso, a avaliação de seus alvos de ligação pode abrir novas perspectivas terapêuticas para o tratamento de transtornos mentais, especialmente a depressão.

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A depressão é um transtorno mental grave e crescente, representando um desafio de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, estimando-se um número superior a 280 milhões de indivíduos afetados (WHO, 2023). A significativa prevalência desse transtorno gera um ônus substancial nos sistemas de saúde e na economia global. Os custos associados à depressão abrangem despesas médicas diretas, além do impacto indireto decorrente do absenteísmo no trabalho, queda de produtividade e aposentadorias precoces, tornando-se um desafio abrangente que requer atenção e ação efetiva em nível mundial (KÖNIG et al., 2021; Wu et al., 2022).

Compreender a depressão e identificar seus fatores de risco é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias preventivas, diagnósticas e terapêuticas eficazes, buscando reduzir o impacto negativo na vida das pessoas afetadas por esse transtorno. Por meio de pesquisas contínuas, tem sido possível aprimorar os métodos de diagnóstico e tratamento, incorporando abordagens terapêuticas diversificadas, uma vez que o tratamento convencional da depressão ainda apresenta várias limitações, como a demora na manifestação dos efeitos terapêuticos, respostas variáveis entre os pacientes, efeitos colaterais indesejados, necessidade de monitoramento frequente e risco de recaída após a interrupção do medicamento.

Esses avanços têm permitido o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, personalizados e acessíveis, resultando em melhorias significativas na qualidade de vida dos indivíduos que enfrentam a depressão. Esses esforços contínuos são cruciais para enfrentar esse desafio de saúde pública de forma mais efetiva e compassiva.

Nesse contexto e com base nos estudos apresentados, a neuroinflamação tem sido amplamente estudada como um componente importante na fisiopatologia da depressão (AFRIDI; SUK, 2021; BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020b; TAYAB et al., 2022). Ao compreender os mecanismos subjacentes da resposta inflamatória no cérebro, podemos identificar novos alvos terapêuticos e desenvolver estratégias de tratamento eficazes. Por isso, substâncias com propriedades anti-inflamatórias têm se destacado como uma abordagem promissora para modular a neuroinflamação e potencialmente aliviar os sintomas da depressão.

Assim, a Riparina III se mostra promissora como um composto de interesse para ser investigado nesse contexto de depressão. A crescente exploração do potencial biológico de compostos naturais tem estimulado pesquisas com múltiplas atividades biológicas, e a Riparina III, com suas propriedades anti-inflamatórias e antidepressivas já demonstradas (MALLMANN et al., 2021), pode representar uma nova abordagem. Investigações adicionais com esse composto podem contribuir para o desenvolvimento de terapias mais efetivas e ajudar a enfrentar esse desafio de saúde pública. Além disso, a combinação das abordagens *in vivo* e *in vitro* proporcionará uma visão abrangente dos efeitos da Riparina III na modulação da neuroinflamação, visto que ainda não há estudos dessa substância nesse modelo.

Por conseguinte, a abordagem da Riparina III em caráter complementar aos antidepressivos convencionais na investigação da depressão representa uma perspectiva inovadora e promissora na terapêutica da depressão. Diferentemente da ação primária dos fármacos clássicos, centrados na modulação monoaminérgica, evidências experimentais sugerem que a Riparina III pode atuar em vias associadas à neuroinflamação, ao estresse oxidativo e à regulação de processos de neuroplasticidade, aspectos cada vez mais reconhecidos na fisiopatologia do transtorno depressivo maior. Dessa forma, a sua utilização pode beneficiar indivíduos refratários às terapias atuais e, simultaneamente, ampliar o espectro de estratégias terapêuticas disponíveis, fortalecendo a perspectiva de um manejo multifatorial e mais individualizado da depressão.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar os efeitos protetores e antidepressivos da Riparina III após neuroinflamação induzida pelo LPS em modelos *in vivo* e *in vitro*.

#### 3.2 Específicos

- Investigar o efeito da Riparina III sobre o comportamento de camundongos expostos ao LPS;
- Avaliar o efeito da Riparina III sobre alterações bioquímicas induzidas pelo LPS nas áreas cerebrais (hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado)
- Analisar o efeito da Riparina III sobre linhagens de astrócitos e células PC12 expostas ao LPS
- Identificar os efeitos da Riparina III sobre os mecanismos de morte celular induzidos por LPS
- Verificar *in silico* a interação da Riparina III com a iNOS

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Ensaios *in vivo*

#### 4.1.1 Animais experimentais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (17 a 25g), adultos, provenientes do Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Estes foram alojados em gaiolas de polipropileno (42 x 20.5 x 20 cm), com ração e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas e ambientados em grupos de 5 por gaiola. O projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº 7259230822 (Anexo A).

#### 4.1.2 Substâncias utilizadas

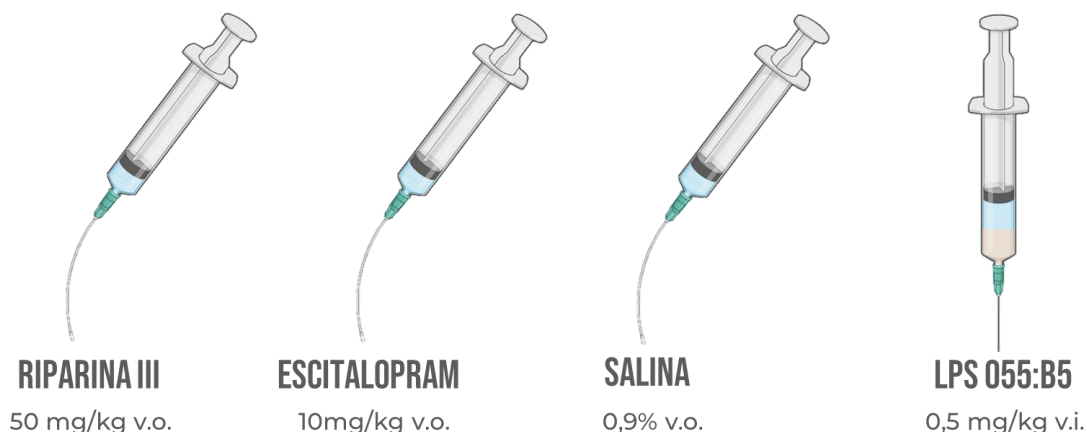
A Riparina III foi obtida por síntese orgânica e adquirida pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil, de acordo com a metodologia descrita na literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Os animais receberam na dose de 50 mg/kg (diluída em água destilada e tween 80®), administrada por via oral através de gavagem. Esta dose foi previamente estudada pelo laboratório de neuropsicofarmacologia (MALLMANN et al., 2021; MELO et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015).

Para indução do modelo depressão-símile, foi utilizado o Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) na dose de 0,5 mg/kg dissolvido em solução salina (0,9%) e administrado via intraperitoneal (i.p.) (DA SILVA et al., 2024; Mello et al., 2021a). O Escitalopram (ESCI) (Oxalato de escitalopram, Sanofi Medley Farmacêutica Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) foi diluído em solução salina 0,9% e administrado através de gavagem por via oral na dose 10mg/kg. A dose foi definida com base em estudos anteriores em modelo animal (BUSSMANN et al., 2024; DRAGON et al., 2025; MELLO et al., 2021b; TOMAZ et al., 2020). Para o teste de dosagem de citocinas inflamatórias, utilizou-se

a Dexametasona (DEX) na dose de 2mg/kg como controle anti-inflamatório, com base em estudos prévios (NASSAR; AZAB, 2022).

Resumidamente, as substâncias utilizadas e suas respectivas doses para o modelo in vivo, encontram-se na figura 6.

Figura 6 - Substâncias utilizadas no modelo in vivo



Fonte: Elaborada pela autora

Cores meramente ilustrativas

Legenda: v.o.: via oral; v.i.: via intraperitoneal.

#### 4.1.3 Desenho experimental

O protocolo experimental, propriamente dito, teve início após duas semanas de aclimação dos animais no Biotério Setorial. Posteriormente, foram realizadas administrações intraperitoneais (i.p.) de LPS, uma vez por dia, durante dez dias, para induzir um comportamento semelhante à depressão nos animais. Do 6º ao 10º dia do protocolo, foi adicionada a administração oral por gavagem das demais substâncias mencionadas, uma hora após a administração do LPS. Os grupos foram organizados da seguinte maneira (Tabela 2).



Tabela 2 - Organização dos grupos experimentais

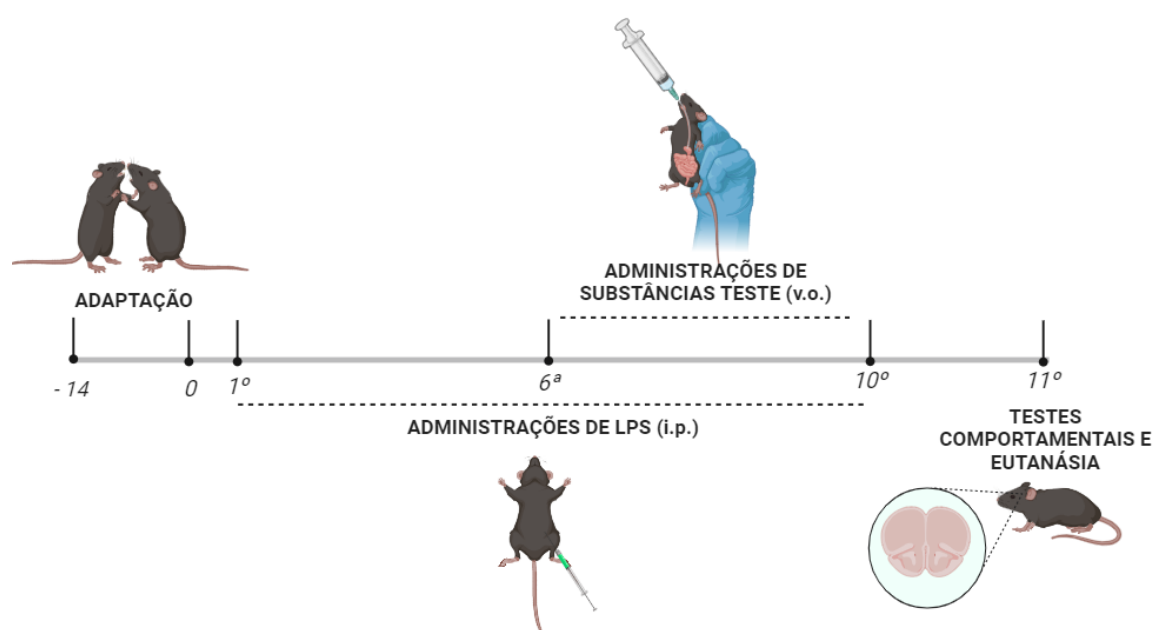
<b>Grupo</b>	<b>Injeções i.p. (1<sup>o</sup>–10<sup>o</sup> dia)</b>	<b>Administração oral v.o. (6<sup>o</sup>–10<sup>o</sup> dia)</b>
Controle (n=10)	Solução salina 0,9%	Solução salina 0,9%
LPS (n=10)	LPS	Solução salina 0,9%
Rip III (n=10)	LPS	Riparina III
ESCI (n=10)	LPS	Escitalopram
DEXA (n=4)	LPS	Dexametasona

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: N=10: número de animais utilizados em cada grupo

Após um intervalo de 24 horas desde a última administração das substâncias testadas, os animais foram submetidos a testes comportamentais. Em seguida, foram eutanasiados utilizando o método de decapitação por guilhotina. Os encéfalos foram prontamente retirados em uma superfície gelada e as seguintes regiões foram armazenadas em microtubos: hipocampo (HP), córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE). Os detalhes do delineamento experimental estão apresentados de forma visual no fluxograma a seguir (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma do protocolo experimental



Fonte: Elaborada pela autora

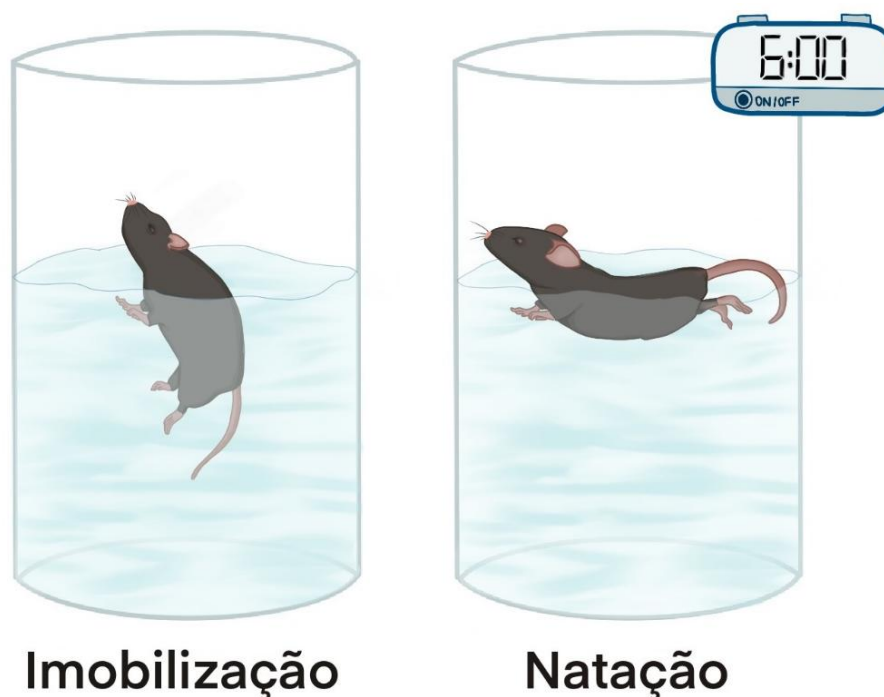
#### 4.1.4 Avaliações comportamentais preditivas de depressão

##### 4.1.4.1 *Teste do Nado Forçado*

O teste de Nado Forçado é utilizado em pesquisas científicas na área da psicologia e neurociência para avaliar a resposta comportamental de animais a situações de estresse e desamparo, sendo comumente empregado como um modelo preditivo de comportamentos relacionados à depressão. Assim, seguiu-se o protocolo estabelecido por Porsolt; Bertin; Jalfre (1978), onde os animais foram colocados em um recipiente contendo água, suficiente para impedir que ele toque o fundo com os pés, forçando-os a nadarem. Inicialmente, o animal tenta escapar nadando, mas depois de um período, ele entra em um estado de imobilidade, flutuando na água sem fazer movimentos significativos. Esse período de imobilidade é considerado um indicativo comportamental de desamparo e resignação, que são características associadas à depressão em humanos.

O protocolo teve duração de 6 minutos, sendo 2 minutos de adaptação. A duração total da imobilidade (medida em segundos) foi registrada durante os últimos 4 minutos de teste por um observador sem conhecimento prévio dos grupos. Considerou-se que o camundongo estava em estado de imobilidade quando ele permanecia flutuando passivamente, embora movimentos sutis fossem permitidos para manter a cabeça acima da água (Figura 8).

Figura 8 - Teste do Nado Forçado



Fonte: Realizada por Stéphanie Balestro através do software Procreate® para iPad.

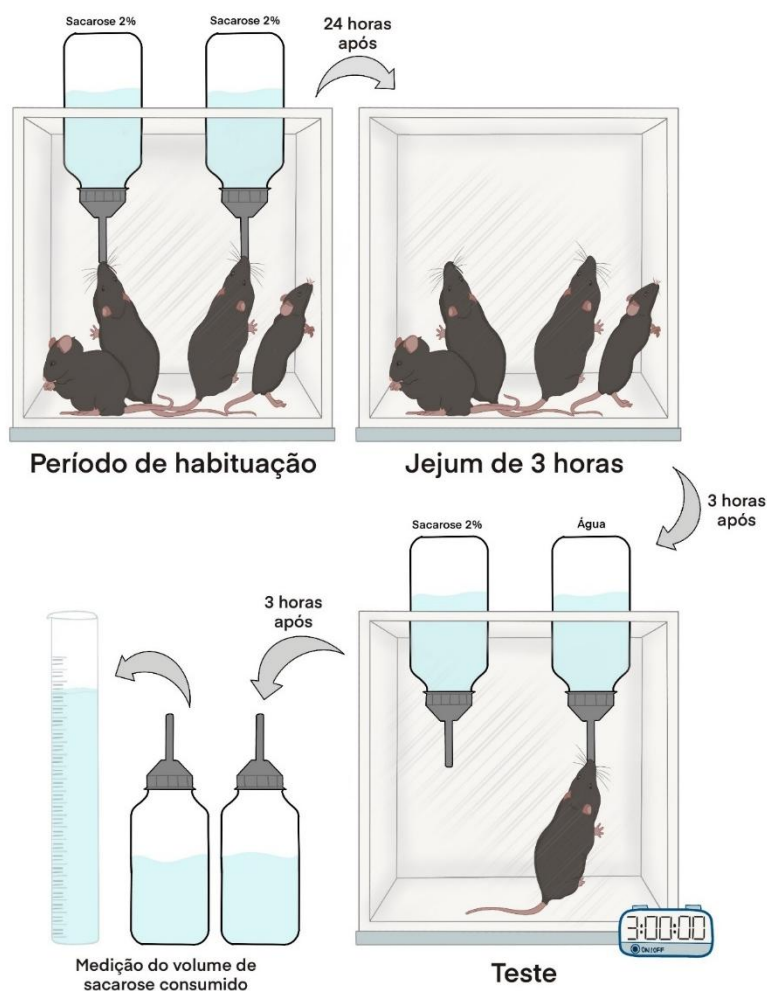
#### 4.1.4.2 Teste de Preferência por Sacarose

O Teste de Preferência por Sacarose é um procedimento comumente utilizado em pesquisas com animais para avaliar a sensibilidade ao prazer e recompensa (a preferência pela solução com açúcar em comparação com a água é interpretada como um sinal de recompensa e prazer). Esse teste é frequentemente usado como um indicador de anedonia, que é a diminuição da capacidade de sentir prazer, um sintoma chave associado à depressão em seres humanos.

Para avaliar este comportamento, seguiu-se o protocolo estabelecido por Wu et al. (2023), com pequenas modificações. Os camundongos foram submetidos a uma fase inicial de adaptação, na qual tiveram acesso a duas garrafas contendo solução de sacarose a 2% durante 24 horas (Figura 9). Após essa adaptação, os camundongos, juntos em suas respectivas caixas, passaram por um período de jejum de 3 horas. Posteriormente, foram colocados em gaiolas individuais e receberam garrafas idênticas contendo 2% de sacarose e água, na medida de 100ml. Após três horas de exposição, as garrafas foram retiradas e medidas em provetas para

determinar o consumo de cada líquido, e os animais devolvidos para suas referidas caixas.

Figura 9 - Teste de preferência pela Solução de Sacarose



Fonte: Realizada por Stéphanie Balestro através do software Procreate® para iPad.

A preferência pela sacarose foi determinada como a porcentagem da quantidade de solução de sacarose consumida em relação ao total de ingestão de líquidos, de acordo com a seguinte fórmula:

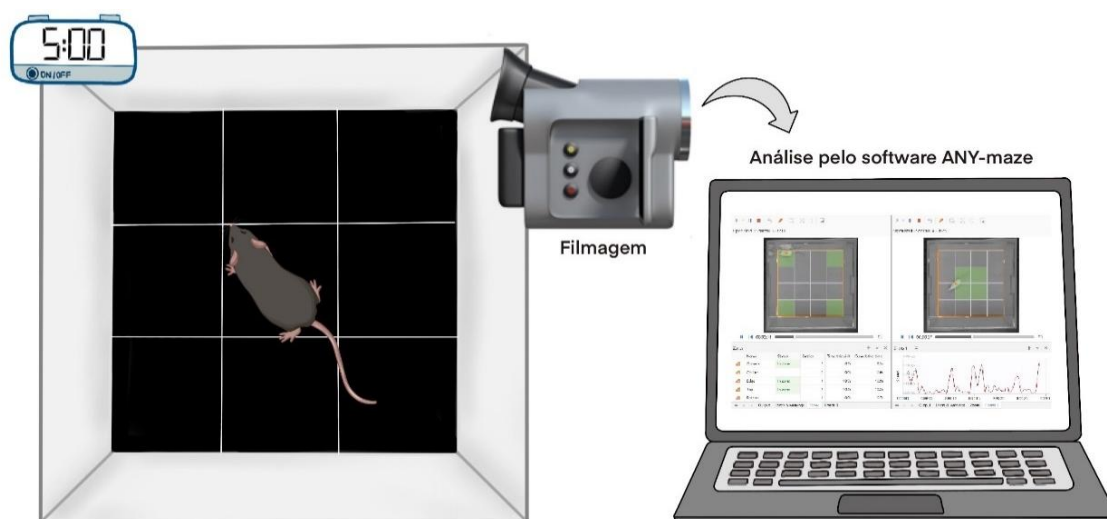
$$\text{Preferência por sacarose} = \frac{\text{Consumo de sacarose}}{\text{Consumo de água} + \text{consumo de sacarose}} \times 100$$

#### 4.1.5 Avaliações comportamentais preditivas de locomoção e ansiedade

##### 4.1.5.1 Teste do Campo Aberto

O Teste do Campo Aberto é utilizado para avaliar a exploração, a ansiedade, a atividade locomotora e outros aspectos do comportamento em um ambiente novo e potencialmente aversivo. O protocolo foi realizado em uma caixa de acrílico branca, com fundo preto, divididos em 9 quadrantes (Figura 10). Durante o teste, os camundongos foram colocados no centro do fundo da caixa e deixados explorar por 5 min. Todos os movimentos foram registrados por vídeo e analisados no software ANY-Maze. As medições incluíram o total de cruzamentos e a distância total; o tempo gasto e a distância percorrida na zona central; e a tigmotaxia, tendência de permanecer próximo às paredes, validada como uma medida do comportamento ansiogênico em camundongos. Este último parâmetro foi avaliado pela porcentagem do tempo percorrido na zona periférica em relação ao tempo total do teste. Após cada teste, para eliminar o efeito do odor, foi utilizado álcool 70% para limpar o fundo da caixa (Yeom et al., 2022).

Figura 10 - Teste do Campo Aberto



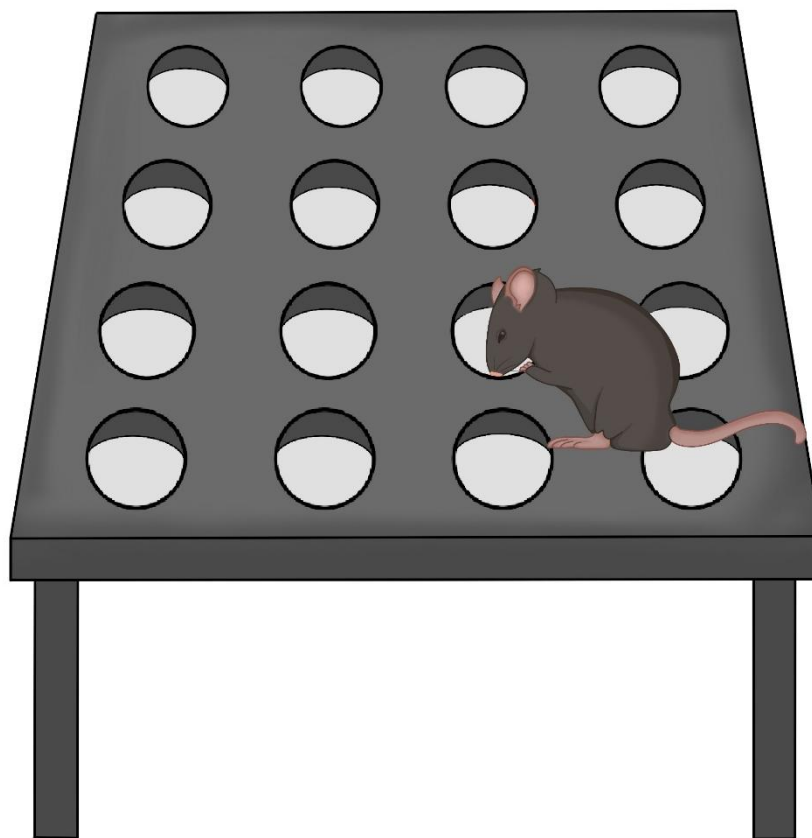
Fonte: Realizada por Stéphanie Balestro através do software Procreate® para iPad.

#### 4.1.5.2 Teste da placa perfurada

O Teste da Placa Perfurada é empregado para avaliar o comportamento a exploração e a ansiedade em camundongos expostos a um ambiente novo. Neste teste, os animais são colocados em uma arena que contém uma placa perfurada com buracos uniformemente espaçados (Figura 11). Cada buraco serve como um local que o animal pode explorar e investigar.

Utilizou-se um aparato equipado com 16 orifícios, e os animais foram colocados no centro da plataforma. O parâmetro analisado foi o número de mergulhos de cabeça, ou seja, a contagem de quantas vezes o animal colocou a cabeça nos orifícios ao longo de um período de 5 minutos (File; Wardill, 1975). A contagem dos mergulhos foi realizada por meio de observação comportamental por avaliadores sem conhecimento prévio dos grupos.

Figura 11 - Teste da Placa Perfurada



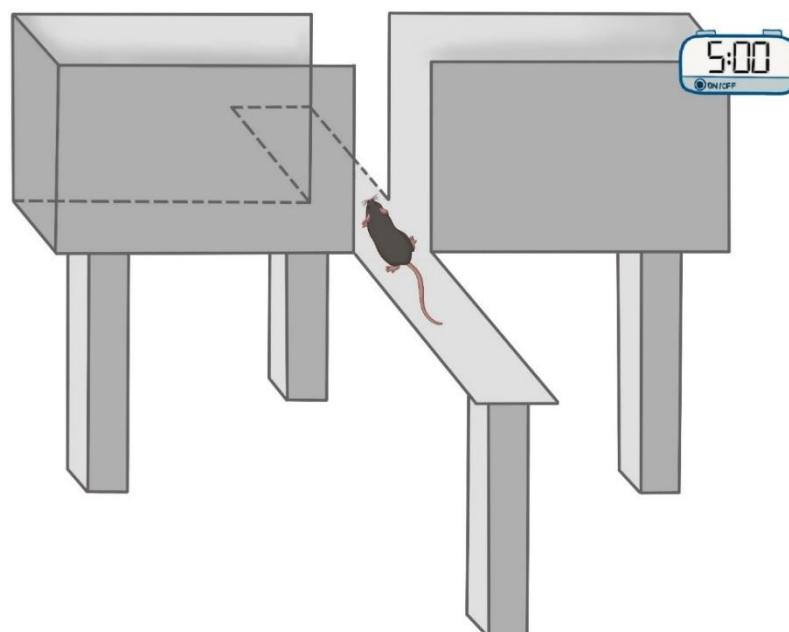
Fonte: Realizada por Stéphanie Balestro através do software Procreate® para iPad.

#### 4.1.5.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O Teste do Labirinto em Cruz Elevado é utilizado para avaliar a ansiedade e a resposta a situações de conflito entre a exploração de um ambiente novo e o medo do ambiente aberto e potencialmente aversivo. O aparato consiste em um dispositivo com formato de cruz (Figura 12), com dois braços abertos e dois braços fechados (com paredes elevadas) com uma plataforma central comum. O teste iniciou ao inserir o animal no centro do labirinto. O tempo de permanência do animal em cada braço e o número de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados durante 5 minutos (Pellow et al., 1985).

Dessa forma, as medidas comportamentais registradas foram: número de entradas nos braços abertos (NEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), número de entradas nos braços fechados (NEBF) e tempo de permanência nos braços fechados (TPBF), e a partir dessas informações, foram medidos os percentuais do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) e do número de entradas nos braços abertos (PEBA). O teste se fundamenta na suposição de que os animais com comportamento ansioso tenderão a passar menos tempo nos braços abertos e apresentarão um menor número de entradas nesses braços. Isso resultará em uma maior preferência por explorar o ambiente fechado do aparato.

**Figura 12** - Teste do labirinto em cruz elevado



Fonte: Realizada por Stéphanie Balestro através do software Procreate® para iPad.

#### 4.1.6 Avaliação comportamental preditiva de memória

##### 4.1.6.1 Teste do Labirinto em Y

O Teste do Labirinto em Y, também conhecido como Y-Maze, é um procedimento utilizado para avaliar a memória de curto prazo, a aprendizagem espacial e a tomada de decisões. O labirinto em Y é uma estrutura em formato de "Y" composta por três braços idênticos, geralmente dispostos a 120 graus um do outro (Figura 13).

O teste foi baseado no protocolo de Sarter; Bodewitz; Stephens (1988), com modificações, utilizando o tempo de 5 minutos ao invés de 8 minutos, por consistir de um aparato pequeno e mais recomendado, segundo as recomendações da Stanford. Assim, cada camundongo foi colocado no centro do aparato, podendo se mover através dele por 5 minutos. A pontuação consiste em registrar cada entrada do braço (definido como todas as quatro patas entrando no braço).

A alternância foi definida como entradas em todos os três braços em ocasiões consecutivas:

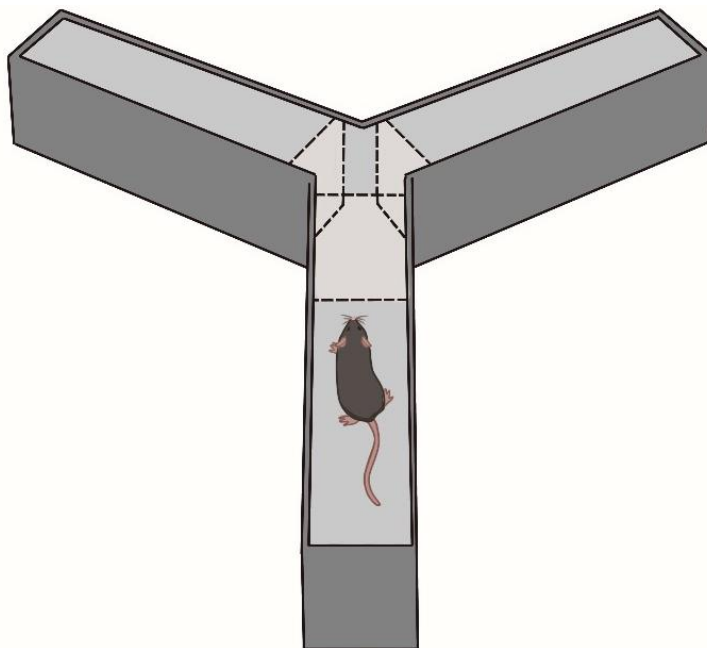
$$\text{Percentual de Alternância (\%)} = \frac{\text{Número de alternâncias reais}}{\text{Entradas totais} - 2} \times 100$$

Por exemplo, se os braços fossem chamados de 1, 2, 3 e o camundongo executasse 12313213312, o número de entradas de braço seria 11, e as alternâncias sucessivas: 123, 231, 132, 321, 213, 312. Portanto, a alternância percentual seria  $[6/(11 - 2)] \times 100 = 66,7$ .

Ao final do teste, o animal foi devolvido à gaiola inicial e o aparato foi limpo com álcool entre os testes.



Figura 13 - Teste do Labirinto em Y



Fonte: Realizada por Stéphanie Balestro através do software Procreate® para iPad.

#### 4.1.7 Avaliação Neuroquímica

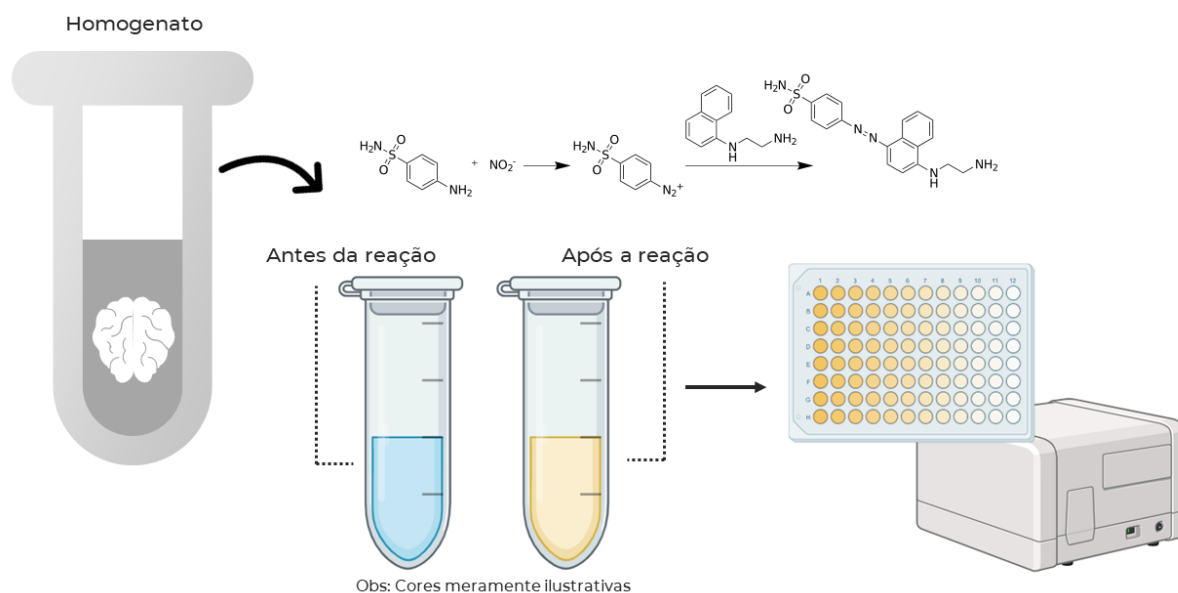
##### 4.1.7.1 Determinação dos níveis de nitrito

Para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a produção de óxido nítrico (NO), os níveis de nitrito foram determinados nos homogenatos de tecido, de acordo com o método descrito por Green; Tannenbaum; Goldman (1981). Os tecidos foram cuidadosamente dissecados, mantidos em gelo e pesados. Cada amostra foi homogeneizada em 1 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, utilizando homogenizador motorizado, sob refrigeração, para preservar a integridade enzimática. Os homogenatos foram então centrifugados a  $10.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante obtido foi utilizado para a análise.

Para a determinação de nitrito, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram misturados com 100  $\mu\text{L}$  do Reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%, N-(1-naftil)etilenodiamina 0,1% e água destilada) e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. A curva padrão foi construída com soluções de  $\text{NaNO}_2$  em concentrações variando de 0,75 a 100  $\mu\text{M}$ , submetidas às mesmas condições experimentais. Os brancos foram preparados adicionando 100  $\mu\text{L}$  do

Reagente de Griess a 100  $\mu$ L do tampão utilizado nos homogenatos. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm, e os resultados expressos em  $\mu$ mol de nitrito por grama de tecido (Figura 14).

Figura 14 - Protocolo de determinação dos níveis de nitrito



Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.1.7.2 Determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente empregada como indicador da peroxidação lipídica, especialmente pela mensuração do malondialdeído (MDA), um dos principais produtos finais da oxidação de lipídios (De Leon; Borges, 2020).

No presente procedimento, homogenatos de hipocampo e córtex pré-frontal (10% em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4) foram utilizados para a reação com ácido tiobarbitúrico. Inicialmente, 63 µL do homogenato foram misturados com 100 µL de ácido perclórico a 35% e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Do sobrenadante, 150 µL foram combinados com 50 µL de ácido tiobarbitúrico a 1,2% e incubados a 95°C por 30 minutos em banho-maria.

Essa incubação promove a formação do complexo MDA-TBA<sub>2</sub>, de coloração rosa-avermelhada, cuja intensidade é proporcional à concentração de TBARS na amostra (Papastergiadis et al., 2012). Após a reação, 150 µL da mistura foram transferidos para placas de 96 poços, e a absorbância foi lida a 535 nm. Os resultados foram expressos em microgramas por grama de tecido (µg/g).

#### *4.1.7.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)*

A glutathiona reduzida (GSH) é o principal antioxidante intracelular do sistema nervoso central, desempenhando papel vital na neutralização de espécies reativas de oxigênio e na regulação redox neuronal (POLADIAN et al., 2023). Para a quantificação da GSH nas amostras cerebrais, utilizou-se o reagente de Ellman (DTNB), que reage com grupos sulfidrilas livres, formando um composto colorido mensurável.

As amostras foram homogeneizadas em tampão EDTA 0,02 M (10% p/v) e tratadas com ácido tricloroacético (50%) para precipitação de proteínas. Após centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para um meio contendo tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e DTNB 0,01 M. A formação do produto foi avaliada por espectrofotometria a 412 nm. Os valores foram obtidos a partir de curva padrão com GSH e expressos em µg/g de tecido.

#### *4.1.7.4 Determinação das concentrações de citocinas pró-inflamatórias*

As regiões cerebrais coletadas (hipocampo e córtex pré-frontal) foram homogeneizadas em tampão PBS contendo inibidores de protease (EMD Biosciences), na proporção de 1:8 (peso/volume). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para análises posteriores.

As concentrações das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 foram determinadas a partir de 50  $\mu$ L do sobrenadante, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) com kits comerciais da R&D® Systems (Minneapolis, EUA), conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas por grama de tecido (pg/g).

## **4.2 Ensaios *in vitro***

### **4.2.1 Obtenção e diluição da Riparina III**

A Riparina III foi a mesma utilizada para os testes *in vivo*, seguindo o mesmo procedimento de síntese e obtenção. A solução-mãe foi preparada através da diluição em Dimetilsulfóxido (DMSO) estéril na concentração de 0,2M. Em seguida, as soluções utilizadas no estudo foram preparadas por meio de diluição seriada em solução salina tampão fosfato estéril (PBS), contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,4 a fim de obter as concentrações 1000  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M 62,5  $\mu$ M, 31,25 e 15,6  $\mu$ M. Importante ressaltar que a concentração final do DMSO não ultrapassou 0,5%, buscando utilizar uma concentração não tóxica para as linhagens celulares.

### **4.2.2 Lipopolissacarídeo**

O Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) foi utilizada na concentração de 50 $\mu$ g/ml, com base em testes realizados anteriormente (SANGARAN et al., 2021), e dissolvido em solução salina tampão fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; pH 7,4).

#### 4.2.3 Manutenção e cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram a linhagem de feocromocitoma de rato, PC12 (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ, BRA), e a linhagem de astrócitos murinos, isolada e fornecida pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) seguindo os protocolos descritos (ERUSTES et al., 2018).

As células foram cultivadas em garrafas de polietileno para cultura com um volume de 250 mL, utilizando os meios de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) e *Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium* (DMEM). Os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em uma estufa a uma temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e o crescimento celular foi observado diariamente sob um microscópio de inversão.

Quando as células atingiram cerca de 80% de confluência, foram desalojadas utilizando tripsina 0.05% em EDTA 0.53 mM. A suspensão de células foi contada utilizando um hemocitômetro do tipo câmara de Neubauer e a densidade celular foi avaliada usando o corante de exclusão azul de Tripán. Em seguida, as células foram subcultivadas em placas de 24 ou 96 poços, dependendo do procedimento a que seriam submetidas.

Os experimentos envolvendo as células, assim como suas manutenções, foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC) da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.2.4 Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT

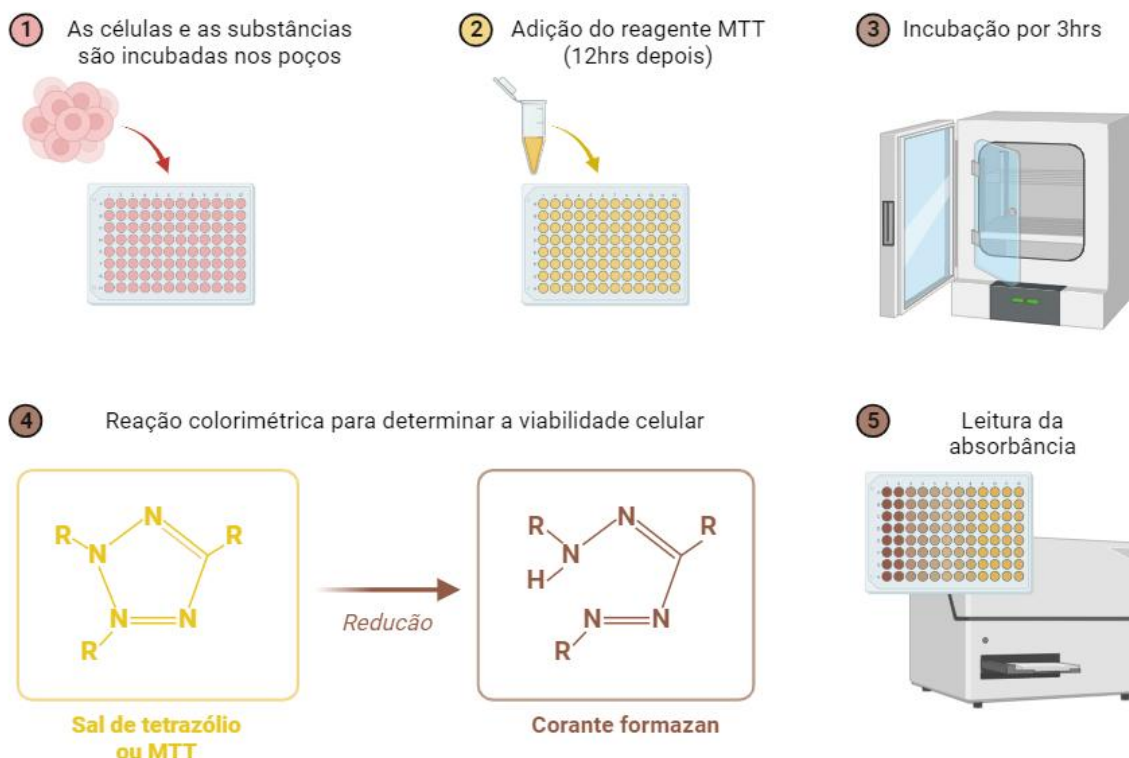
Para avaliar a ação da Riparina III sobre a viabilidade celular e determinar a faixa de concentração considerada não tóxica para as linhagens utilizadas, foi utilizado o ensaio MTT, baseado na capacidade da enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias e no citosol de células viáveis do Ciclo de Krebs, em converter o sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT) de cor amarelada em cristais de formazan de cor púrpura. Esse ensaio é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade e o estado metabólico celular, sendo uma ferramenta útil na análise da citotoxicidade (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983).

Neste ensaio, a Riparina III foi adicionada às culturas previamente incubadas nas concentrações seriadas, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 e 15,6  $\mu\text{M/mL}$ . Após 12 horas de incubação, as células foram tratadas com um novo meio contendo 200  $\mu\text{L}$  de MTT a 5  $\text{mg/mL}$  em cada poço e incubadas por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DMSO puro para a lise celular e solubilização do formazan. As placas foram colocadas em um agitador por 30 minutos e, posteriormente, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 595 nm (Figura 15). A viabilidade foi dada através do aumento da conversão do MTT, no qual considerou-se a média da absorbância do controle como 100%, enquanto os outros valores receberam valores proporcionais de acordo com a absorbância apresentada. A inibição da redução do MTT indica uma diminuição na viabilidade celular.

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

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

Figura 15 - Princípio do Teste do MTT



Fonte: Elaborada pela autora

Após a determinação de quais concentrações da Riparina III seriam viáveis e escolher as melhores concentrações, as células foram expostas ao LPS e, em seguida, a Riparina III para verificar a proteção, também via MTT. Em seguida foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à morte celular, alteração na membrana mitocondrial, e avaliação da morfologia celular.

#### 4.2.5 Avaliação dos mecanismos de morte celular por marcação de Iodeto de Propídio (PI) e Anexina V (Anx)

A análise dos diferentes estágios de morte celular foi realizada por meio de dupla marcação com anexina V (Anx) e iodeto de propídio (PI) – uma estratégia amplamente validada para diferenciar células viáveis, em apoptose (precoce e tardia) e necrose, especialmente por citometria de fluxo (KUMAR; SANEJA; PANDA, 2021).

Essa metodologia baseia-se em dois eventos celulares fundamentais:

1. Exposição da fosfatidilserina: em células viáveis, a fosfatidilserina está restrita à face interna da membrana plasmática. Durante a apoptose precoce, ocorre sua translocação para a face externa, tornando-se acessível à anexina V, uma proteína com alta afinidade por esse fosfolípido. Quando conjugada à fluoresceína isotiocianato (FITC) e na presença de cálcio, a anexina V permite a detecção sensível de células em apoptose inicial (WORSLEY; VEALE; MAYNE, 2022).

2. Integridade da membrana plasmática: o iodeto de propídio é um corante que se intercala ao DNA, porém não penetra membranas íntegras. Assim, ele é excluído por células viáveis e por aquelas em apoptose precoce, mas é incorporado por células com membranas danificadas — como em apoptose tardia ou necrose — indicando comprometimento da integridade celular (RICKELS et al., 2012).

Para conduzir a análise, as células foram expostas ao LPS por 12 horas, seguido da aplicação da riparina III, na concentração de 62,5  $\mu$ M, por mais 12 horas (melhor concentração observada nos experimentos). Para isso, as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação, e posteriormente incubadas com 5  $\mu$ L de Anexina V-FITC e 5  $\mu$ L de iodeto de propídio, ambos utilizados na concentração de 0,5 mg/mL. A coloração foi realizada utilizando um kit comercial da BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, EUA).

Antes da incubação, as células foram avaliadas no microscópio óptico para avaliação morfológica das células.

Após 15 minutos de incubação em ambiente protegido da luz, foram adicionados 400  $\mu$ L de tampão de ligação. A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o citômetro FACSCalibur (BD Biosciences).

A análise dos eventos celulares permitiu a classificação em quatro populações principais: (1) Células viáveis: não marcadas por Anexina V nem por PI; (2) Células em apoptose precoce: marcadas apenas por Anexina V; (3) Células em apoptose tardia ou necrose inicial: marcadas por Anexina V e PI; (4) Células necróticas: marcadas apenas por PI.

#### 4.2.6 Avaliação das alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)



A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica avançada de imagem que permite a observação de detalhes microscópicos em alta resolução de superfícies de amostras. Com o objetivo de verificar os danos causados pelo LPS e confirmar os efeitos preventivos da Riparina, foi realizada uma análise por MEV. Ao contrário da microscopia óptica, a MEV utiliza um feixe de elétrons em vez de fótons. Esse feixe é gerado a partir de um cátodo e direcionado para a amostra. Quando o feixe primário interage com a amostra, os elétrons perdem energia por dispersão, e os elétrons dispersos são captados por um detector, que cria uma imagem virtual com o auxílio de um software (CHIHANGA et al., 2018).

Para realizar a MEV, as células PC12 e os astrócitos foram cultivados em lamínulas de vidro circulares estéreis. As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em 0,1 M (pH 7,2) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratadas utilizando concentrações crescentes de etanol e revestidas com uma camada de 20 nm de ouro utilizando um dispositivo de pulverização de íons QT150 ES-Quorum. As amostras foram então avaliadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG-FEI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

#### 4.2.7 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca da apoptose, a qual é ativada por estresse intra ou extracelular levando a formação de poros e efluxo de íons  $H^+$ , induzindo uma alteração no potencial transmembrânico. A rodamina 123 (Rho123), um corante fluorescente lipossolúvel e nucleofílico, é sequestrada para dentro da mitocôndria quando esta apresenta variação de potencial transmembrânico da mitocôndria inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas enquanto que as mitocôndrias com polarização alterada terão menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (Gorman et al., 1997; Qiao; Wong, 2009).

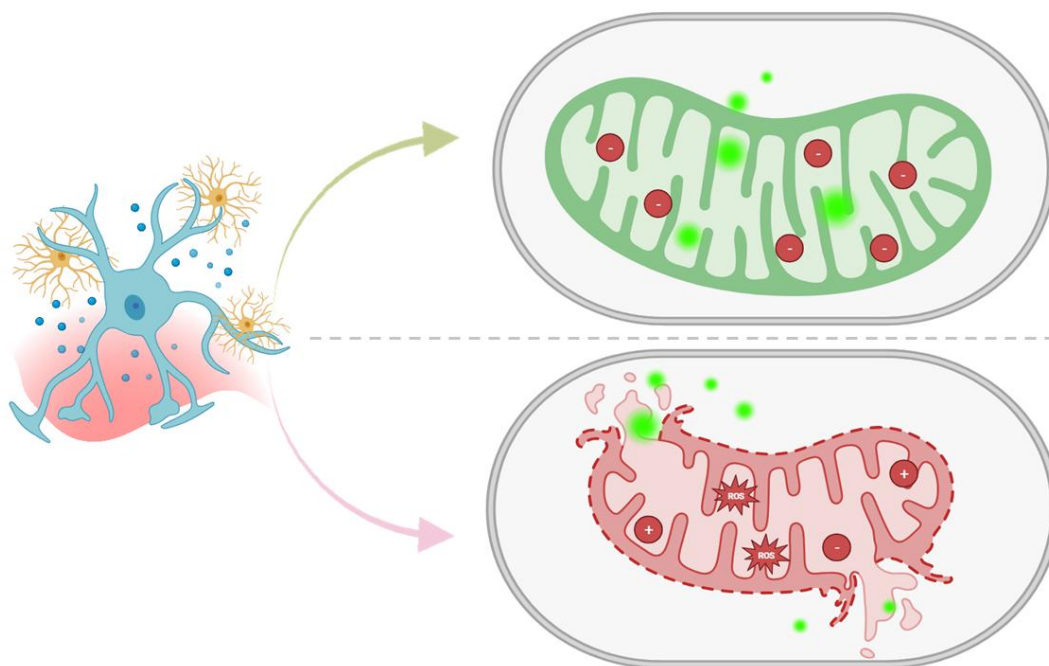
As células foram submetidas ao tratamento com a Riparina, após 12 horas de incubação com o LPS. Ao término das 12 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células foi marcado com Rho123

(concentração final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por meia-hora para, em seguida, ser processado em citômetro de fluxo com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm.

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 16). Sendo assim, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada através do filtro de fluorescência vermelha (FL2). Essa intensidade de fluorescência relativa é calculada comparando a fluorescência das células tratadas com a fluorescência do controle negativo (células não tratadas).

Na figura 16, o painel superior demonstra mitocôndria funcional, com produção basal de espécies reativas e potencial transmembrana preservado, atraindo o corante rodamina para seu interior. O painel inferior ilustra aumento de estresse oxidativo, perda da integridade mitocondrial e ativação de vias de morte celular, associadas à resposta inflamatória no sistema nervoso central.

Figura 16 - Princípio do teste de avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial por Rodamina



Fonte: Elaborada pela autora

### 4.3 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. Foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (pós teste) para resultados paramétricos ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (pós teste) para os não paramétricos.

Em todas as análises estatísticas, os dados considerados paramétricos foram representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Os dados não paramétricos foram representados como mediana e intervalo interquartil, com valores significativos quando  $p < 0,05$ .

### 4.4 Estudo *in silico*

#### 4.4.1 Preparação dos ligantes e da proteína-alvo

As estruturas químicas da Riparina III (CID182537) e do inibidor da NOS – L-Name (CID39836) foram obtidas no repositório PubChem nas conformações 2D (“PubChem”, [s.d.]). A otimização das estruturas 3D com menor energia conformacional foi realizada aplicando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) utilizando o *software* Avogadro versão 1.2.0 (Hanwell et al., 2012). A proteína-alvo é a Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS na sigla inglesa), que consiste em um homodímero (subunidades A e B) que possuem dois cofatores no sítio catalítico do substrato L-Arginina (L-Arg), um grupo heme e a (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4). Apenas a subunidade A da iNOS depositada no repositório *Protein Data Bank* (PDB ID: 1M9T) foi selecionada para as simulações de docking (“RCSB PDB: Homepage”, [s.d.]; (Rosenfeld et al., 2002). A preparação da proteína-alvo consistiu na retirada de moléculas de água, solventes, subunidade B e inibidor co-cristalizado utilizando o *software* UCSF Chimera™ versão 1.15 e na adição de

hidrogênios polares utilizando o *software* AutoDockTools™ versão 1.5.6 (MORRIS et al., 2009; Pettersen et al., 2004).

#### 4.4.2 Simulação de docking molecular e obtenção dos resultados

As simulações de ancoragem entre ligante e proteína-alvo foram realizadas utilizando o *software* AutodockVina™, que se baseia no Algoritmo Genético Lamarckiano com exaustão de 1024 simulações (Trott; Olson, 2009). A definição do GridBox que envolvesse toda a estrutura da proteína-alvo foi feita utilizando o *software* AutoDockTools™, definindo os eixos  $x = 125,736$ ,  $y = 110,345$  e  $z = 32,454$  e as dimensões de  $x = 64$ ,  $y = 76$  e  $z = 62$  em angstrom (Å). A técnica de redocking com o inibidor co-cristalizado, 3-Bromo-7-Nitroindazol (INE, CID1649), foi realizada a fim de validar as simulações de docking. Após as simulações, a melhor pose foi selecionada a partir dos valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), sendo aceitável valores menores ou iguais a -6,00 Kcal/mol e valores de RMSD (*Root-Mean-Square Distance*) menores ou iguais a 2,0 Å (De Oliveira et al., 2021). A região de ancoragem e os tipos de interações foram obtidos utilizando o *software* Discovery Studio Visualizer™ versão 21.1.0.20298 (“BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, 21.1.0.20298, San Diego: Dassault Systèmes, 2023”, [s.d.]).

As ligações de hidrogênio foram consideradas como o tipo de interação intermolecular com maior força de afinidade, tendo sua intensidade estratificada de acordo com a distância entre os átomos doadores e aceptores, classificadas em forte quando a distância está entre 2,5-3,1 Å, moderada entre 3,1-3,55 Å e fraca quando maior que 3,55 Å (IMBERTY et al., 1991).

## 5 RESULTADOS

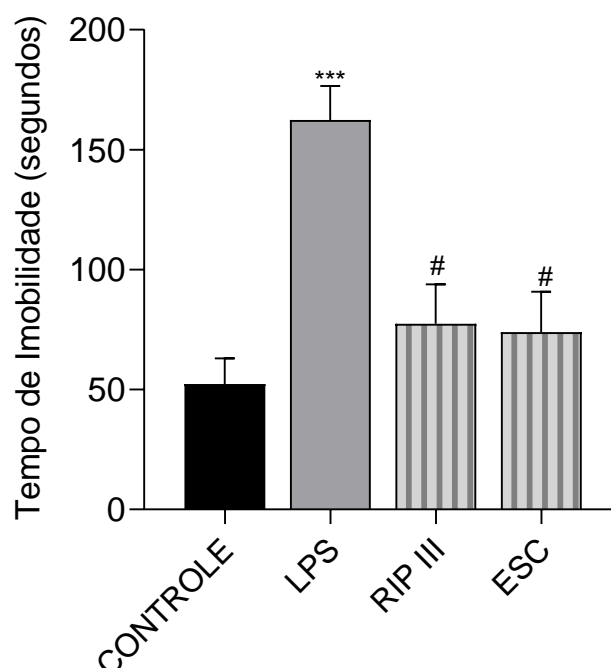
### 5.1 Testes Comportamentais

#### 5.2.1 Testes preditivos de depressão

##### *5.2.1.1 Efeito da administração da Riparina III sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado*

Conforme ilustrado na Figura 17, o LPS provocou um aumento ( $153 \pm 16,07s$ ,  $p < 0,05$ ) no tempo de imobilidade dos animais, em comparação ao grupo controle ( $56,00 \pm 11,26s$ ). Por outro lado, a administração da Riparina III reverteu o efeito do LPS, resultando em uma redução no tempo de imobilidade ( $77,63 \pm 16,32s$ ,  $p < 0,05$ ). Esse padrão similar também foi observado no grupo tratado com Escitalopram ( $81,75 \pm 20,32s$ ,  $p < 0,05$ ).

Figura 17 - Efeito da Riparina III sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado

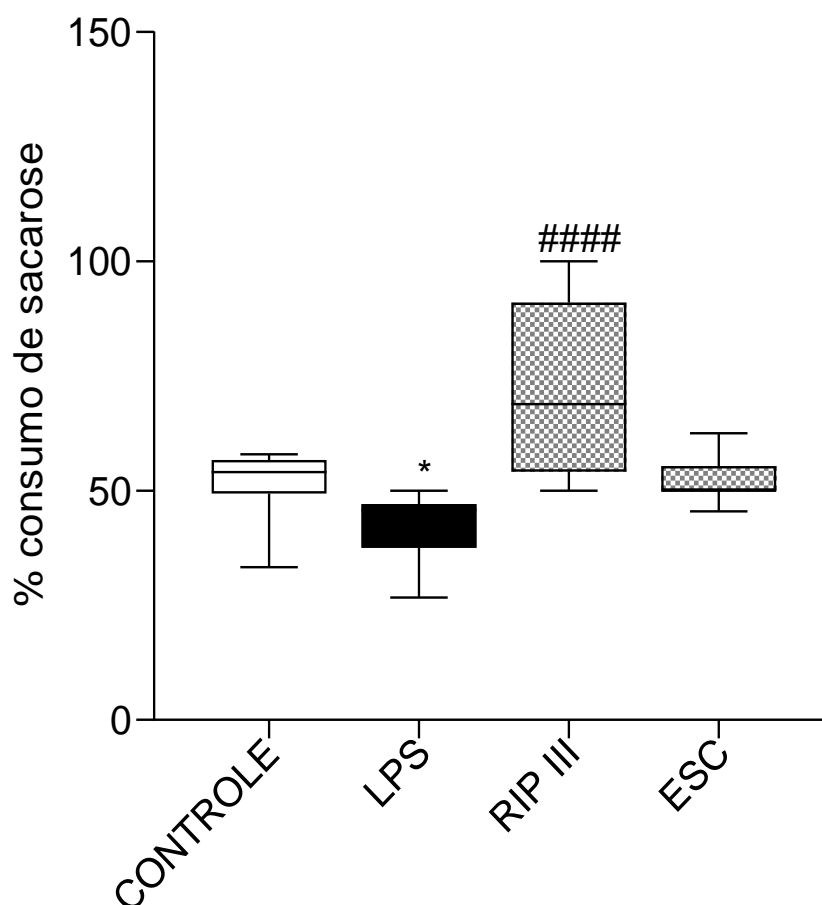


Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: Lps (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a média ± E.P.M. Para análise estatística, foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle; # $p < 0,05$  vs. LPS.

#### 5.2.1.2 Efeito da administração da Riparina III sobre o comportamento anedônico em camundongos submetidos ao teste de preferência pela solução de sacarose

O grupo de animais que recebeu administração de LPS demonstrou uma redução (46,67% [40,97 – 47,06%]) na preferência pela solução de sacarose em comparação com o grupo controle (54,17% [50,00 – 56,83%]) (Figura 18). Em contraste, os grupos submetidos ao tratamento com Riparina exibiram um aumento na preferência pela sacarose (68,89% [54,15 – 91,00%]) em comparação com o grupo que recebeu LPS. Em relação ao grupo tratado com Escitalopram (50,00% [50,00 – 55,37%]), não foram observadas diferenças.

Figura 18 - Efeito da Riparina III sobre o comportamento anedônico no Teste de Preferência à Sacarose



Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a mediana e os intervalos interquartis (Q1 – Q3). Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn, onde \* $p < 0,05$  vs. Controle; ####  $p < 0,0001$  vs. LPS.

## 5.2.2 Testes preditivos de locomoção e ansiedade

### 5.2.2.1 Efeito da administração da Riparina III sobre a atividade locomotora, exploratória e de ansiedade-símile em camundongos submetidos ao teste do campo aberto

No parâmetro do número de cruzamentos no teste de campo aberto, foram observadas diferenças ao comparar o grupo LPS ( $115,1 \pm 13,64$ ) com o grupo controle

( $307,8 \pm 14,92$ ) (Figura 19A). Além disso, semelhante ao grupo controle, o tratamento com Escitalopram ( $234,1 \pm 16,48$ ) também apresentou diferenças em comparação com o grupo LPS. O mesmo não ocorreu com o grupo que recebeu Riparina ( $156,1 \pm 13,22$ ).

Quanto à distância percorrida em metros (Figura 19B), também foi observada uma redução no grupo LPS ( $25,97 \pm 4,055\text{m}$ ) em comparação com o grupo controle ( $76,64 \pm 2,868\text{m}$ ). Não houve diferença no grupo tratado com Riparina ( $34,83 \pm 2,876\text{m}$ ) em comparação ao grupo LPS. Por outro lado, o grupo tratado com Escitalopram percorreu uma distância significativamente maior ( $52,88 \pm 3,090\text{m}$ ) em comparação ao grupo LPS.

Ao avaliar o número de entradas na zona central (Figura 19C), o grupo LPS ( $14,88 \pm 3,050$ ) apresentou um quantitativo menor ( $p < 0,05$ ) em contraposição ao controle ( $56,88 \pm 2,715$ ). Não houve diferença em relação ao grupo que recebeu Riparina ( $21,88 \pm 2,655$ ). Ao contrário, o Escitalopram demonstrou aumentar o número de entradas nesta referida zona ( $47,63 \pm 5,526$ ).

Na avaliação do cruzamento na zona central (Figura 19D), o grupo LPS apresentou uma redução ( $11,71 \pm 3,021$ ) em relação ao grupo controle ( $93,00 \pm 8,302$ ). De forma similar, o grupo tratado com Escitalopram aumentou o número de cruzamentos ( $55,75 \pm 7,568$ ) em comparação com o grupo LPS. Não houve diferença no grupo tratado com Riparina ( $49,29 \pm 2,514$ ) em relação ao grupo LPS.

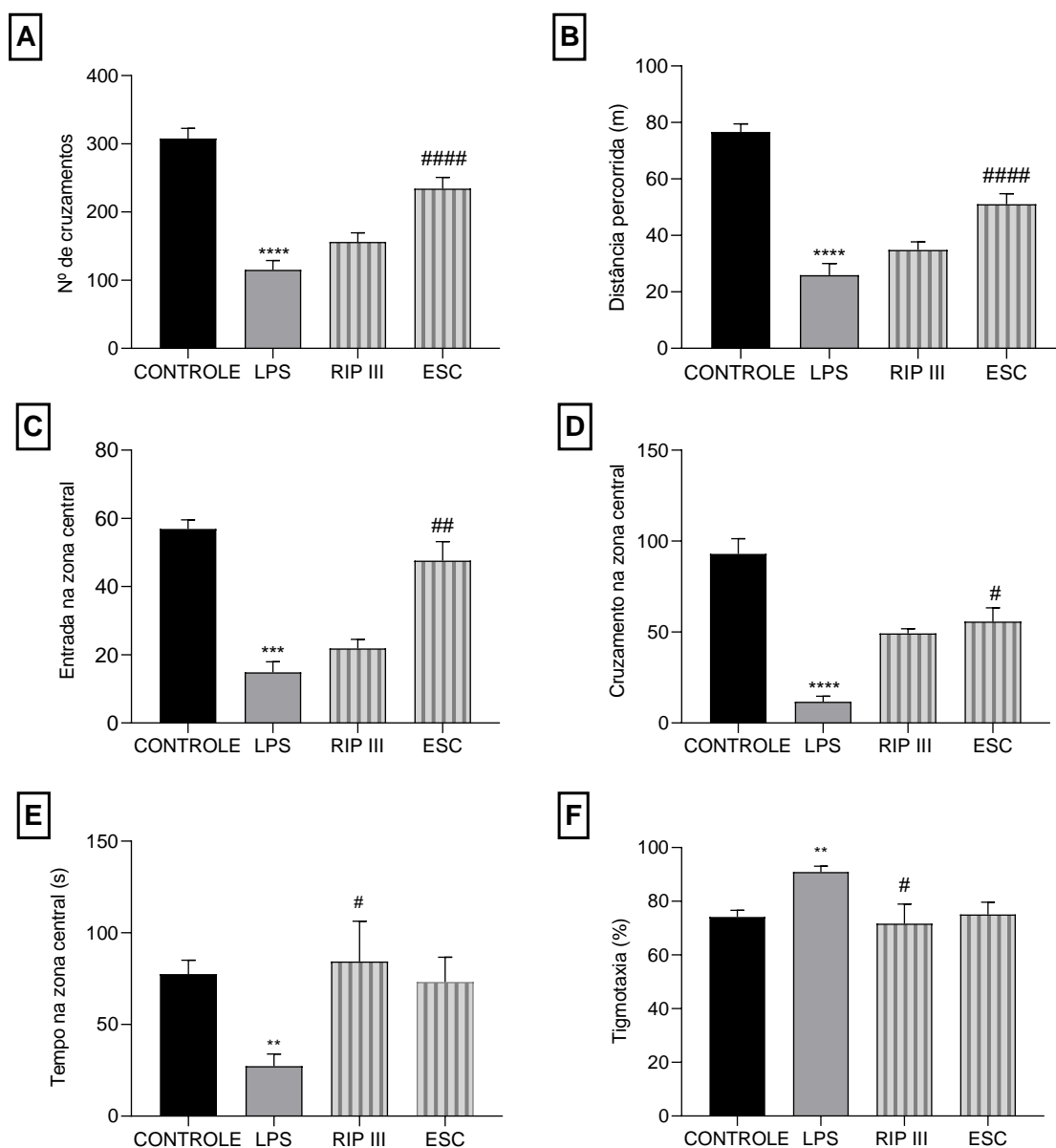
Em relação ao tempo, em segundos, transcorrido na região central (Figura 19E), observou-se uma diferença entre os grupos submetidos a LPS e controle (LPS:  $27,33 \pm 6,513\text{s}$ ; CONTROLE:  $77,54 \pm 7,504\text{s}$ ). De maneira análoga ao grupo controle, o conjunto tratado com Riparina também demonstrou um aumento de tempo na região central ( $84,40 \pm 21,91\text{s}$ ) em comparação ao grupo LPS. No entanto, não foi possível identificar diferença no grupo tratado com Escitalopram ( $73,18 \pm 13,53\text{s}$ ).

Da mesma forma, na avaliação da tigmotaxia, tendência de permanecer próximo às paredes, validada como uma medida do comportamento ansiogênico em camundongos (Figura 19F), registrou-se diferença ao comparar o grupo LPS ( $90,89 \pm 2,171\%$ ) com o grupo controle ( $74,15 \pm 2,501\%$ ). O grupo tratado com Riparina também exibiu uma diminuição na tigmotaxia ( $71,67 \pm 7,273\%$ ) quando comparado ao grupo LPS. No grupo tratado com Escitalopram ( $75,09 \pm 4,578\%$ ), não houve diferença.



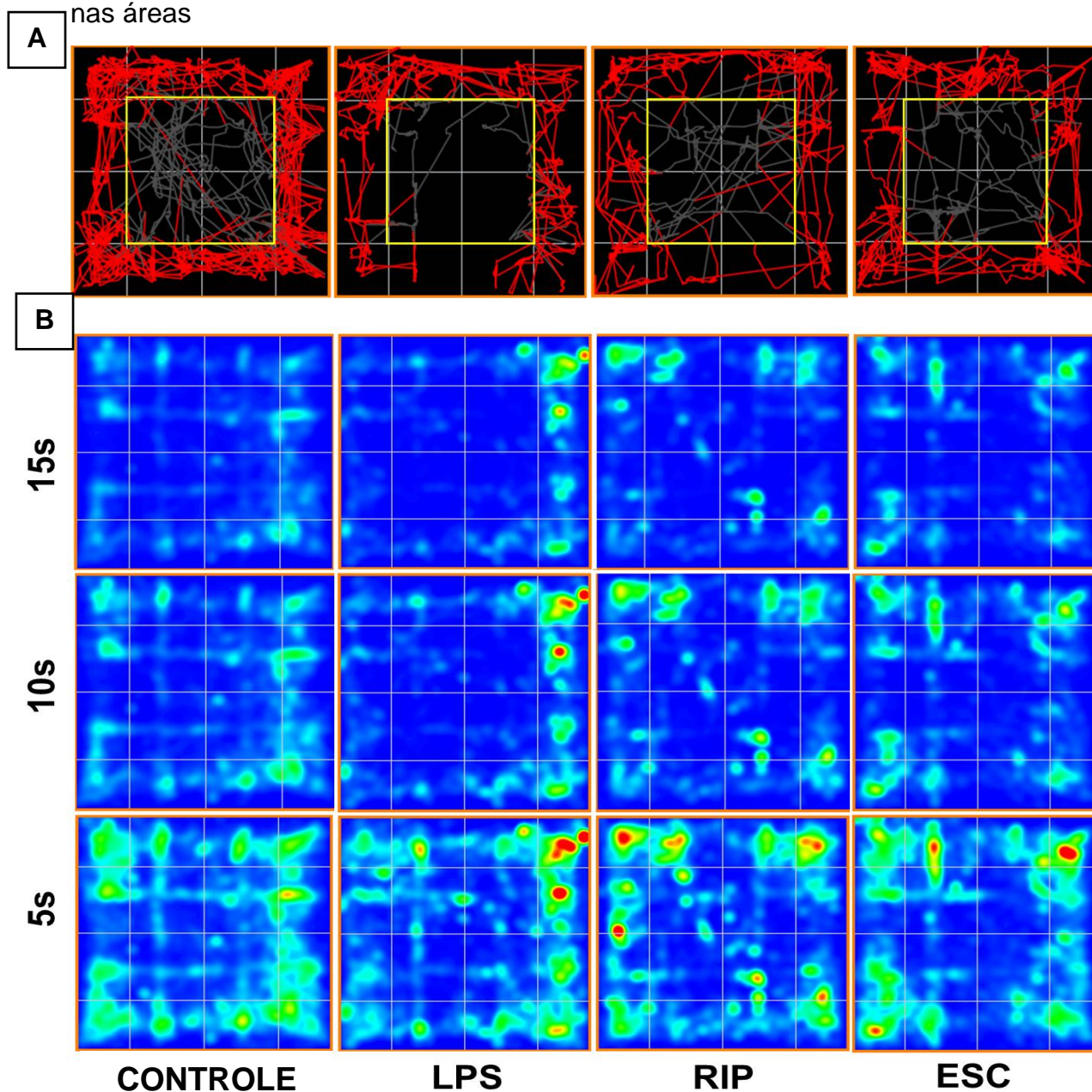
A representação visual da trajetória precisa dos animais e das áreas da arena em que passaram mais tempo ou exibiram maior atividade está apresentada nas Figuras 20A e 20B, respectivamente. O mapa de calor (Figura 20B) ilustra a média de tempo de permanência dos camundongos nas diferentes áreas, com intervalos de duração de 15, 10 e 5 segundos.

Figura 19 - Efeito da Riparina III sobre parâmetros preditivos de locomoção, exploração e ansiedade-símile no Teste do Campo Aberto



Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, onde \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Controle; ## $p < 0,01$  vs. LPS; #### $p < 0,0001$  vs. LPS.

Figura 20 - Mapa de trajetória do animal e mapa de calor de permanência do animal nas áreas

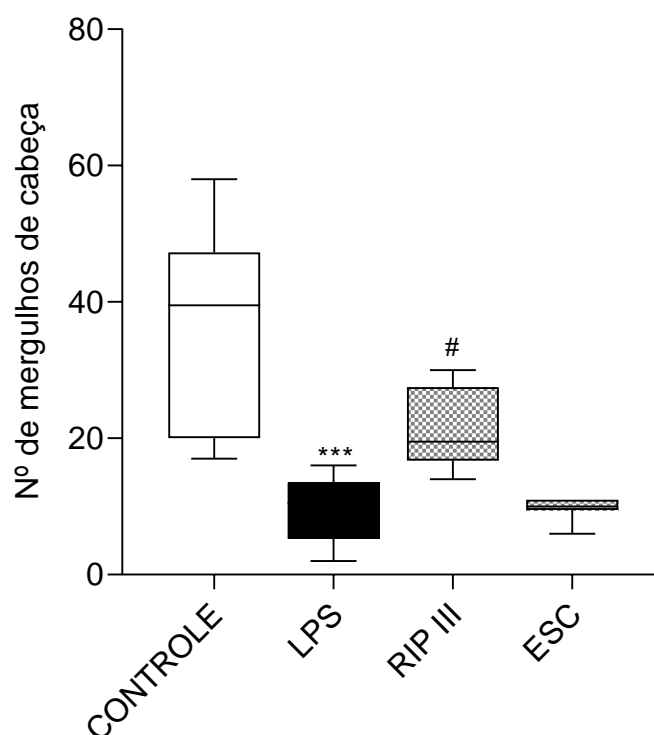


Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). As figuras representam a média representativa dos grupos, sendo a Figura 19A demonstrando a trajetória dos animais em todo o aparato, nas áreas periféricas, e na área central (quadrado amarelo); a figura 19B representa um gradiente de cores, onde os tons de cores mais quentes (vermelho e amarelo) indicam áreas onde o animal passou mais tempo, e os tons mais frios (azul e verde) representam áreas onde o animal passou menos tempo.

### 5.2.2.2 Efeito da administração da Riparina III sobre a atividade locomotora, exploratória e de ansiedade-símile em camundongos submetidos ao teste da placa perfurada

No Teste da Placa Perfurada (Figura 21), o grupo que recebeu administração de LPS exibiu uma diminuição (10,50 [5,25 – 13,5]) no número de mergulhos na placa perfurada, quando comparado ao grupo controle (39,50 [20,0 – 47,25]). Por outro lado, a administração da Riparina reverteu essa redução (19,50 [16,75 – 27,50]) em relação ao grupo que recebeu LPS, enquanto o tratamento com Escitalopram não indicou alterações (10,0 [9,50 – 11,0]).

Figura 21 - Efeito da Riparina III sobre o número de mergulhos no Teste da Placa Perfurada



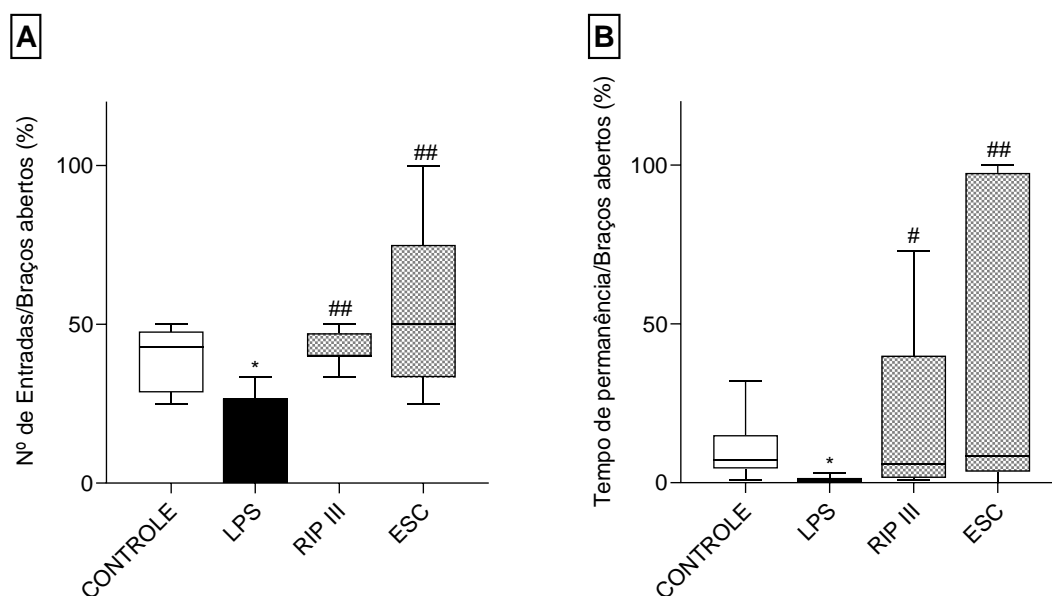
Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a mediana e os intervalos interquartis (Q1 – Q3). Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn, onde \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle; #  $p < 0,05$  vs. LPS.

### 5.2.2.3 Efeito da administração da Riparina III sobre o comportamento de ansiedade-símile no teste do labirinto em cruz elevada

No número de entrada no braço aberto (Figura 22A), o grupo LPS demonstrou uma redução (0,00% [0,00 – 26,00%]) em comparação com o grupo controle (42,86% [28,57 – 47,73%]). A administração de Riparina resultou em um aumento desse parâmetro (40,00% [40,00 – 47,22%]), assim como o tratamento com Escitalopram (50,00% [33,33 – 75,00%]), quando comparados ao grupo LPS.

No que diz respeito à porcentagem referente ao tempo de permanência nos braços abertos (Figura 22B), os animais submetidos ao LPS apresentaram uma redução nesse parâmetro (1,00% [0,00 – 1,50%]) em relação ao grupo controle (7,00% [4,50 – 15,00%]). De forma semelhante ao grupo saudável, os grupos tratados com Riparina (6,00% [1,50 – 40,00%]) e Escitalopram (8,29% [3,50 – 97,50%]) exibiram um aumento nesse parâmetro em comparação com o grupo LPS.

Figura 22 - Efeito da administração de Riparina III sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (A), e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (B), no teste do Labirinto de Cruz Elevada



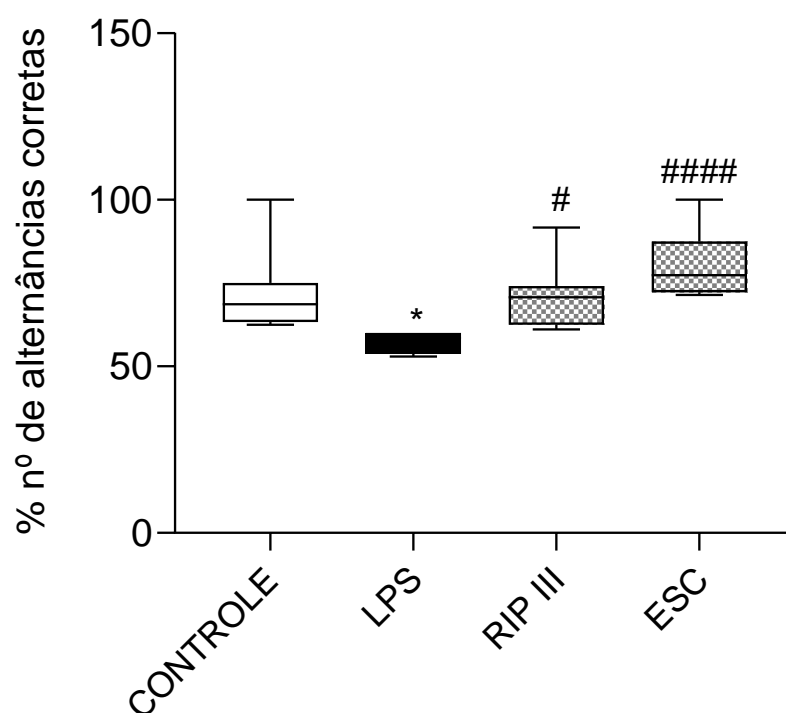
Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a mediana e os intervalos interquartis (Q1 – Q3). Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn, onde \*p<0,05 vs. Controle; #p<0,05 vs. LPS; ##p<0,01 vs. LPS.

### 5.2.3 Teste preditivo de memória de curto prazo

#### 5.2.3.1 Efeito da administração da Riparina III sobre o déficit de memória no teste do Labirinto em Y

Ao avaliar o número de alternâncias corretas no teste do labirinto em Y, verificaram-se diferenças entre os grupos avaliados (Figura 23). O grupo submetido ao tratamento com LPS apresentou menos alternâncias corretas (58,57% [53,77 – 60,00%]) em comparação ao grupo controle (68,63% [63,28 – 75,00%]). Adicionalmente, o grupo tratado com Riparina exibiu um desempenho superior (70,71% [62,67 – 74,11%]) ao grupo LPS. De forma semelhante, ocorreu com o grupo tratado com Escitalopram (77,35% [72,32 – 87,50%]).

Figura 23 - Efeito da administração de Riparina III sobre a memória de curto prazo no Teste do Labirinto em Y

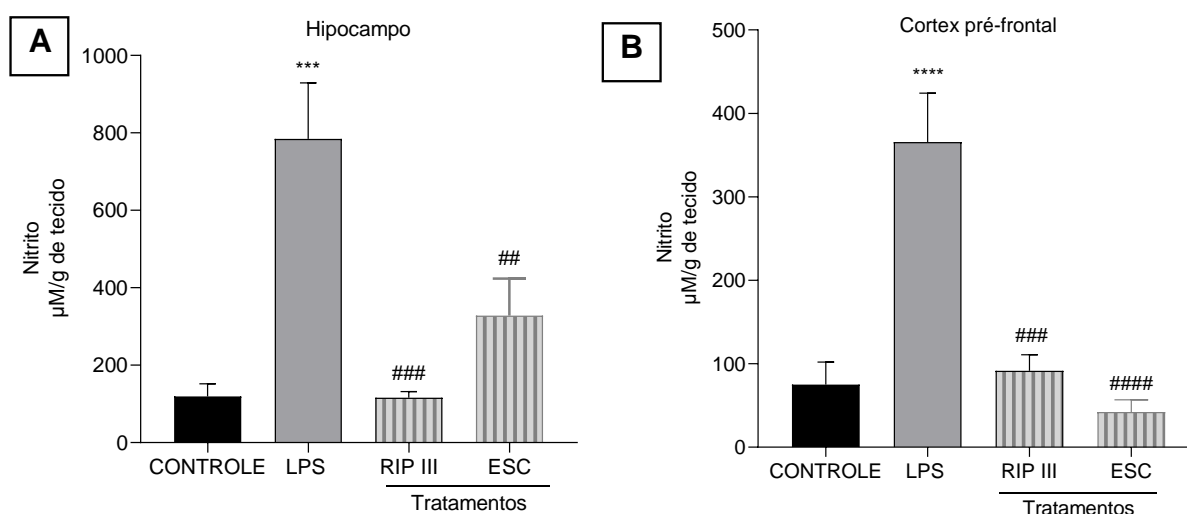


Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a mediana e os intervalos interquartis (Q1 – Q3). Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn, onde \* $p < 0,05$  vs. Controle; # $p < 0,05$  vs. LPS; #### $p < 0,0001$  vs. LPS.

### 5.3 Efeito da Riparina III sobre o estresse nitrosativo (concentração de nitrito) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos expostos a LPS

Na avaliação da dosagem de nitrito (Figura 24), o grupo com administração de LPS apresentou um aumento na concentração de nitrito nas áreas analisadas, hipocampo ( $784,4 \pm 144,6 \mu\text{M}$ , Figura 26A) e córtex pré-frontal ( $365,6 \pm 58,63 \mu\text{M}$ , Figura 24B) quando comparado ao grupo controle ( $119,3 \pm 32,43 \mu\text{M}$ ;  $75,02 \pm 26,96 \mu\text{M}$ ; respectivamente). Além disso, os tratamentos com Riparina ( $116,1 \pm 15,43 \mu\text{M}$ ;  $91,52 \pm 19,22 \mu\text{M}$ ) e Escitalopram ( $328,2 \pm 95,48 \mu\text{M}$ ;  $42,22 \pm 14,59 \mu\text{M}$ ) reverteu esse aumento, quando comparado ao grupo LPS, em todas as áreas cerebrais.

Figura 24 - Efeitos da Riparina sobre a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao LPS

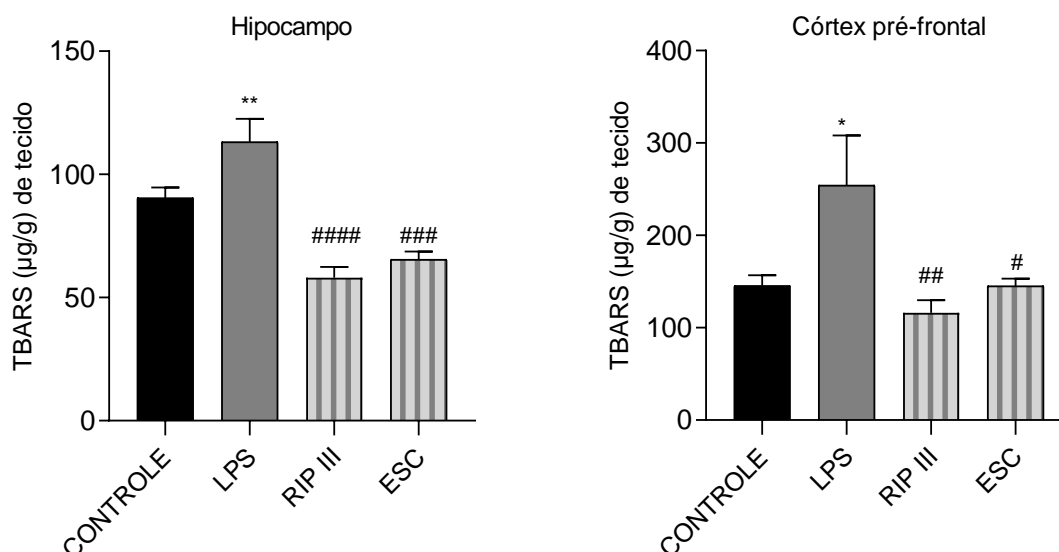


Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA, seguido do pós teste de Tukey, onde \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle; \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Controle; ## $p < 0,01$  vs. LPS; ### $p < 0,001$  vs. LPS; #### $p < 0,0001$  vs. LPS.

#### 5.4 Efeito da Riparina III sobre a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos expostos a LPS

Na Figura 25, observa-se que o LPS aumentou os níveis de TBARS no hipocampo ( $113,2 \pm 9,315 \mu\text{g/g}$ , Figura 25A) e córtex pré-frontal ( $254,3 \pm 53,79 \mu\text{g/g}$ , Figura 25B) em comparação ao grupo controle ( $90,40 \pm 4,248 \mu\text{g/g}$ ;  $145,6 \pm 11,28 \mu\text{g/g}$ , respectivamente). Os tratamentos com Riparina ( $58,01 \pm 4,485 \mu\text{g/g}$ ;  $116,2 \pm 13,52 \mu\text{g/g}$ ) e Escitalopram ( $65,46 \pm 3,205 \mu\text{g/g}$ ;  $145,3 \pm 7,974 \mu\text{g/g}$ ) reverteram esse aumento, quando comparado ao grupo LPS, nas duas áreas cerebrais.

Figura 25 - Efeitos da Riparina sobre a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao LPS



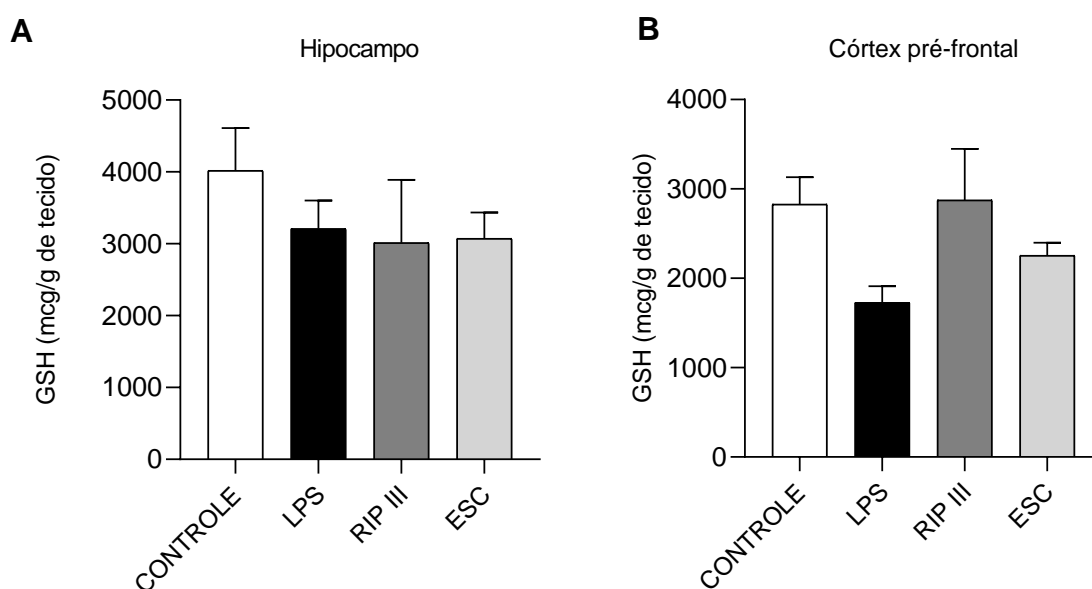
Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA, seguido do pós teste de Tukey, onde \* $p < 0,05$  vs. Controle; \*\* $p < 0,01$  vs. Controle; # $p < 0,05$  vs. LPS; ## $p < 0,01$  vs. LPS; ### $p < 0,001$  vs. LPS; ####  $p < 0,0001$  vs. LPS.



### 5.5 Efeito da Riparina III sobre a concentração de Glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo e córtex pré-frontal

Os níveis de GSH não apresentaram diferença entre os grupos, em ambas as áreas cerebrais (Figura 26, A e B).

Figura 26 - Efeitos da Riparina sobre a concentração de nitrito ( $\mu\text{M/g}$  de tecido) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos expostos ao LPS



Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA, seguido do pós teste de Tukey.

### **5.6 Efeito da Riparina III sobre a concentração de citocinas: Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) e Interleucina 6 (IL-6) no hipocampo e córtex pré-frontal**

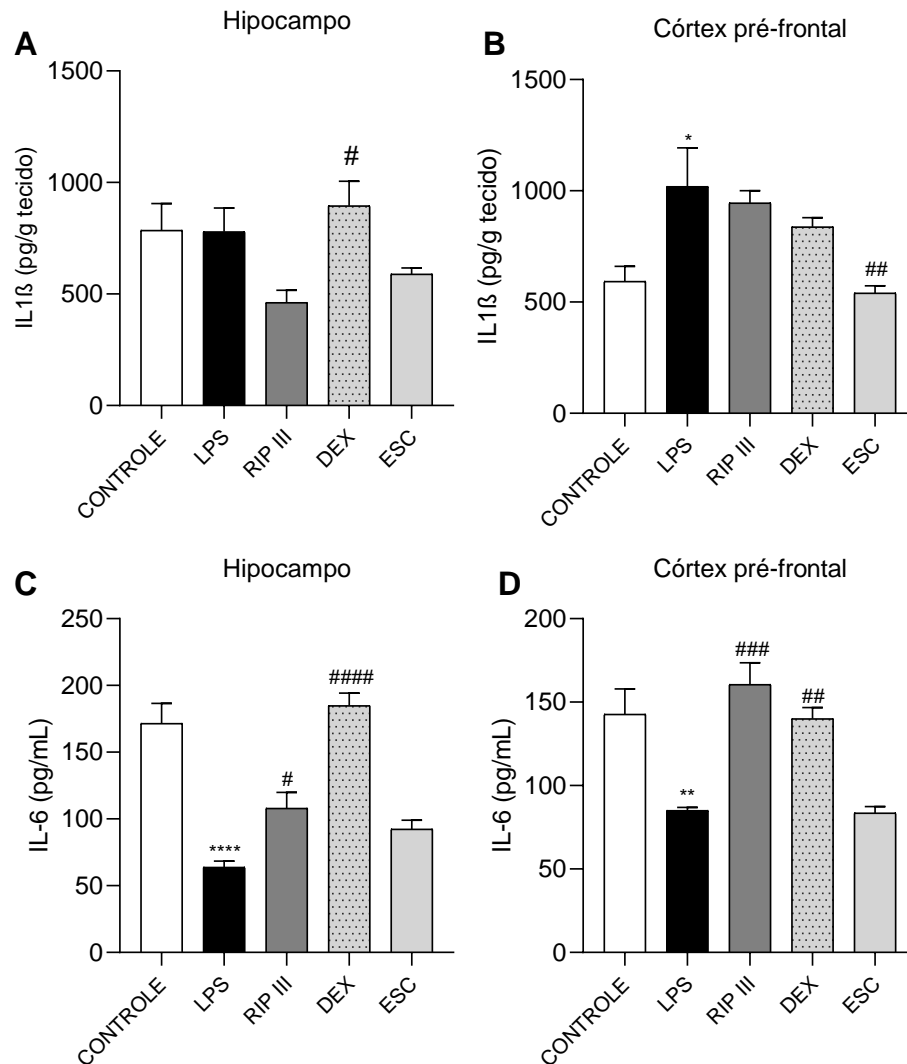
A administração do LPS não aumentou IL-1 $\beta$  no hipocampo de forma significativa ( $779,3 \pm 106,5$  pg/g) em relação ao grupo controle ( $786,2 \pm 119,4$  pg/g). A Riparina ( $462,4 \pm 54,73$  pg/g), Dexametasona ( $895,4 \pm 110,8$  pg/g) e Escitalopram ( $589,9 \pm 27,42$  pg/g) também não causaram mudanças relevantes nessa região (Figura 27 A).

Já no córtex pré-frontal, o LPS aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  ( $1019 \pm 174,4$  pg/g) em relação ao grupo controle ( $593,6 \pm 67,31$  pg/g), sendo revertido pelo uso do escitalopram ( $540,9 \pm 32,21$  pg/g). Porém, nem a Riparina ( $945,3 \pm 55,13$  pg/g), nem o grupo que recebeu dexametasona ( $838,6 \pm 41,20$  pg/g) conseguiram reduzir os níveis dessa interleucina de forma significativa (Figura 27 B).

Em relação aos níveis de IL-6 (Figura 27 C) no hipocampo, curiosamente o LPS reduziu ( $63,80 \pm 4,684$  pg/g) os níveis de IL-6 em comparação ao grupo controle ( $171,5 \pm 15,07$  pg/g). O tratamento com a Riparina aumentou IL-6 ( $107,9 \pm 11,87$  pg/g) em relação ao LPS, enquanto Dexametasona teve efeito ainda mais intenso ( $184,8 \pm 9,504$  pg/g). O grupo que recebeu escitalopram ( $92,33 \pm 6,788$  pg/g) não apresentou mudança significativa comparada com o LPS.

No córtex pré-frontal (Figura 27 D), o LPS também reduziu a IL-6 ( $85,13 \pm 1,781$  pg/g) quando comparado ao grupo controle ( $142,8 \pm 15,08$  pg/g). De forma semelhante ao grupo controle, a Riparina ( $160,5 \pm 13,09$  pg/g) e a Dexametasona ( $140,1 \pm 6,733$  pg/g) aumentou significativamente os níveis dessa citocina em relação ao grupo LPS. O escitalopram não apresentou efeito pronunciado.

Figura 27 - Efeito da Riparina III nos níveis de citocinas: Interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) e Interleucina-6 (IL-6) em hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente, de animais submetidos ao LPS



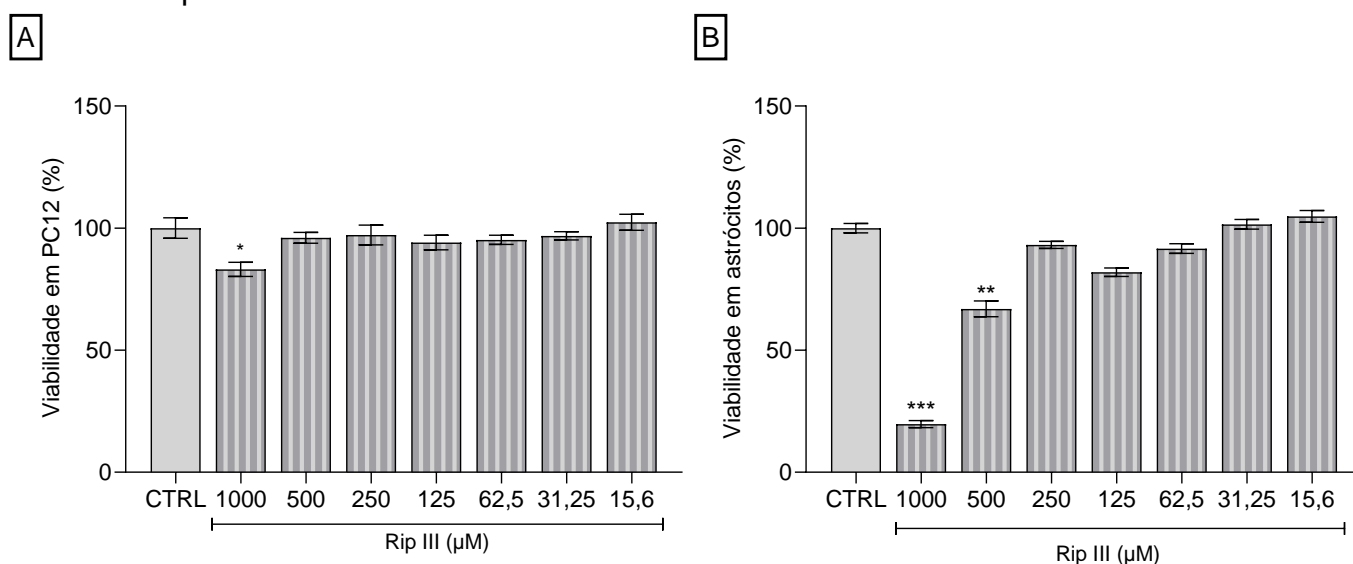
Controle (soro fisiológico 0,9%); LPS: LPS (0,5 mg/kg); Rip (Riparina III 50mg/kg); DEX (dexametasona 2mg/kg); ESC (Escitalopram 10mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA, seguido do pós teste de Tukey, onde \* $p < 0,05$  vs. Controle; \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Controle; # $p < 0,05$  vs. LPS; ## $p < 0,01$  vs. LPS; ### $p < 0,001$  vs. LPS; #### $p < 0,0001$  vs LPS.

## 6 RESULTADOS IN VITRO

### 6.1 Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT

Verificou-se que, nas concentrações examinadas, a Riparina III ocasionou uma redução na viabilidade celular na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  na linhagem de PC12 (Figura 28A), e nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{M}$  nos astrócitos (Figura 28B). Logo, essas concentrações foram excluídas das etapas subsequentes dos ensaios (Tabela 3).

Figura 28 - Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a ação da Riparina III na viabilidade de células PC12 e astrócitos



CTRL: Controle. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA, seguido do pós teste de Tukey, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. Controle.

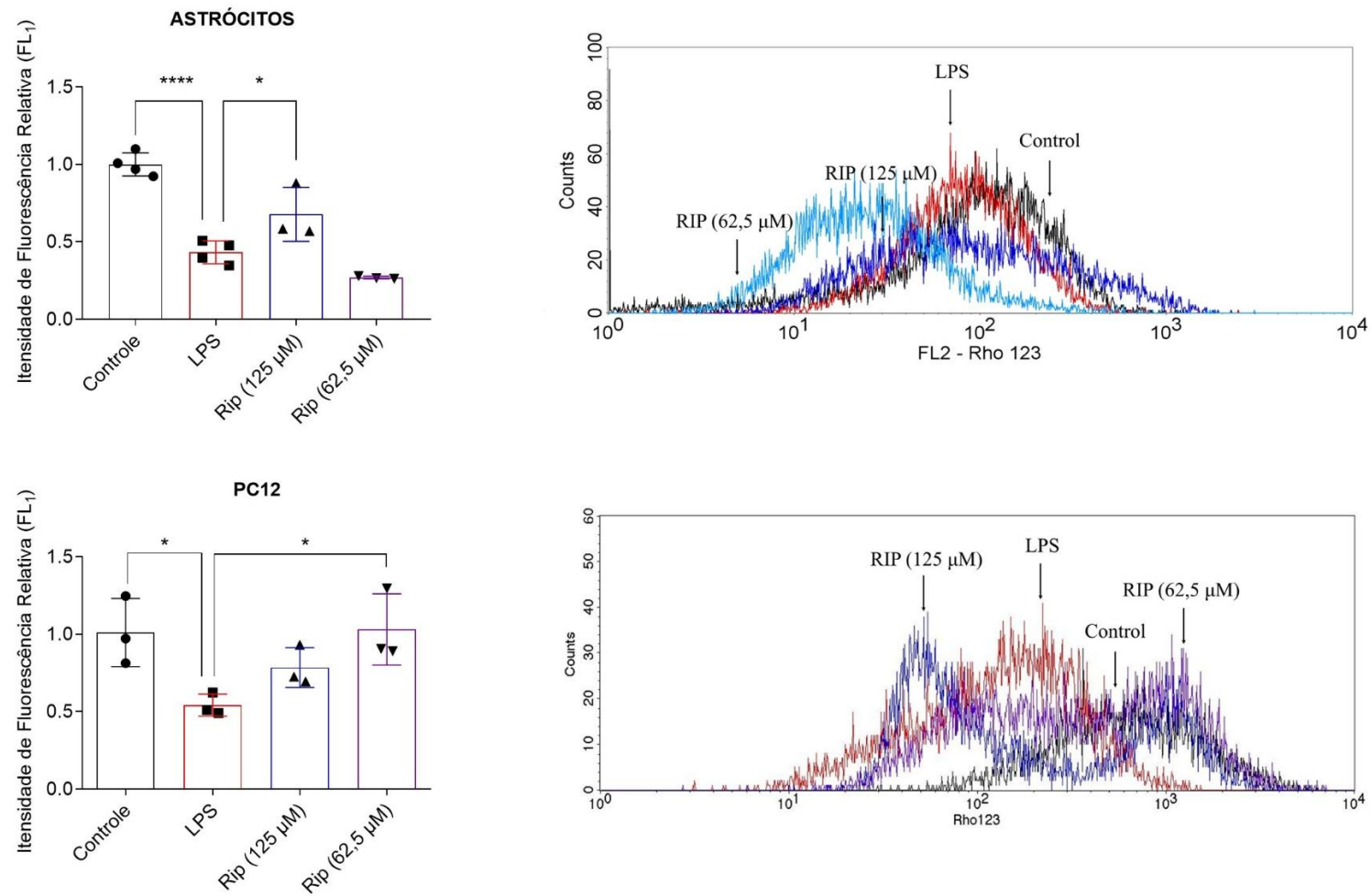


## 6.2 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

A intensidade de fluorescência relativa de rodamina123, referente ao potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em astrócitos, está representada na figura 29 A. Observou-se que o LPS reduziu a intensidade de fluorescência relativa ( $0,43 \pm 0,03$ ) quando comparado ao controle ( $1,00 \pm 0,03$ ). O tratamento com a Rip III na concentração de  $125\mu\text{M}$  aumentou a fluorescência ( $0,67 \pm 0,10$ ). Nas células PC12 (Figura 29 B), o LPS também reduziu a fluorescência ( $0,54 \pm 0,04$ ) em comparação com o controle ( $1,01 \pm 0,12$ ). Ao contrário dos astrócitos, Riparina III na concentração de  $62,5\mu\text{M}$  demonstrou efeito aumentando a fluorescência ( $1,03 \pm 0,13$ ).

A figura 29 ilustra os histogramas de ambos os tipos celulares, à direita. Estes mostram o potencial transmembrana. Em astrócitos e em PC12, o controle (representado pela cor preta) apresenta fluorescência voltada para o lado direito, indicando manutenção ou aumento do potencial transmembrana. O LPS, em contrapartida, desloca o histograma para a esquerda, indicando redução desse potencial. A Riparina III  $125\mu\text{M}$  (azul escuro), em astrócitos, apresentou um pico mais próximo do controle, sugerindo efeito protetor parcial contra a queda do potencial causada pelo LPS. Ao contrário desta, a Riparina III  $62,5\mu\text{M}$  (azul claro), apresentou maior deslocamento à esquerda, indicando perda acentuada do  $\Delta\Psi_m$ . Em PC12, esta última concentração (roxo), demonstrou maior deslocamento à direita, indicando possível hiperpolarização mitocondrial nessa linhagem, diferente do que ocorre com o LPS (vermelho), demonstrando pelo pico mais voltado para o lado esquerdo, indicando redução do  $\Delta\Psi_m$ .

Figura 29 - Efeito da Riparina III no potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de astrócitos e PC12



Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. Para a análise estatística foi utilizado o teste de ANOVA, seguido do pós teste de Tukey, onde \*\*\*\*p < 0,0001 vs. CTRL; \*p < 0,01 vs. CTRL; #p < 0,05 vs. LPS.

### 6.3 Avaliação dos mecanismos de morte celular por marcação de Iodeto de Propídio (PI) e Anexina V (Anx) diante da ação da Riparina frente a exposição das células PC12 e astrócitos ao LPS

Os resultados com astrócitos (Figura 30 A) mostraram que, nas células não marcadas (PI-/ Anx-), as células com LPS apresentou menor número de eventos ( $63,35 \pm 8,66$  %) em comparação ao controle ( $98,50 \pm 0,45$  %), enquanto o tratamento com Rip III aumentou a porcentagem de eventos ( $76,17 \pm 10,10$  %), indicando redução de danos.

No processo indicativo de apoptose precoce (PI-/Anx+), o LPS aumentou a marcação das células ( $12,06 \pm 1,36$  %), ao comparar com o controle ( $0,09 \pm 0,01$  %). A redução desse dano foi visualizada após o tratamento com a Riparina ( $2,81 \pm 1,50$  %). No caso de apoptose tardia ou necrose inicial (Pi+/Anx+), o LPS aumentou a marcação ( $7,56 \pm 2,74$  %) em comparação ao grupo controle ( $0,00 \pm 0,00$  %), enquanto a Riparina reduziu esse dano ( $2,77 \pm 2,57$  %).

Nas células marcadas com PI (PI+/Anx-), indicando provável evento de necrose, observou-se maior porcentagem de eventos no grupo LPS ( $17,02 \pm 5,26$  %) quando comparado com controle ( $1,40 \pm 0,43$  %). O grupo de células expostas ao LPS e tratado com a Riparina não apresentou diminuição significativa de eventos com essa marcação ( $13,90 \pm 3,66$  %).

Na linhagem de PC12 (Figura 30 B), o LPS diminuiu a porcentagem de eventos nas células não marcadas ( $85,69 \pm 2,81$  %), mas o tratamento com a Riparina reverteu esse efeito, aumentando esse percentual ( $96,06 \pm 1,32$  %) para quase próximo ao controle ( $97,67 \pm 0,67$  %).

No processo indicativo de apoptose, a marcação aumentou com o LPS ( $19,27 \pm 2,98$  %), mas foi reduzida pelo tratamento com a Riparina ( $3,13 \pm 0,01$  %), semelhante ao controle ( $0,08 \pm 0,01$  %). Já no grupo de dupla marcação (Pi+/Anx+), indicando necrose ou apoptose tardia, o LPS aumentou o dano ( $13,24 \pm 0,14$  %) comparado com o grupo controle que não apresentou nenhum evento ( $0,00 \pm 0,00$  %), enquanto a Riparina apresentou um efeito protetor ( $2,14 \pm 0,12$  %).

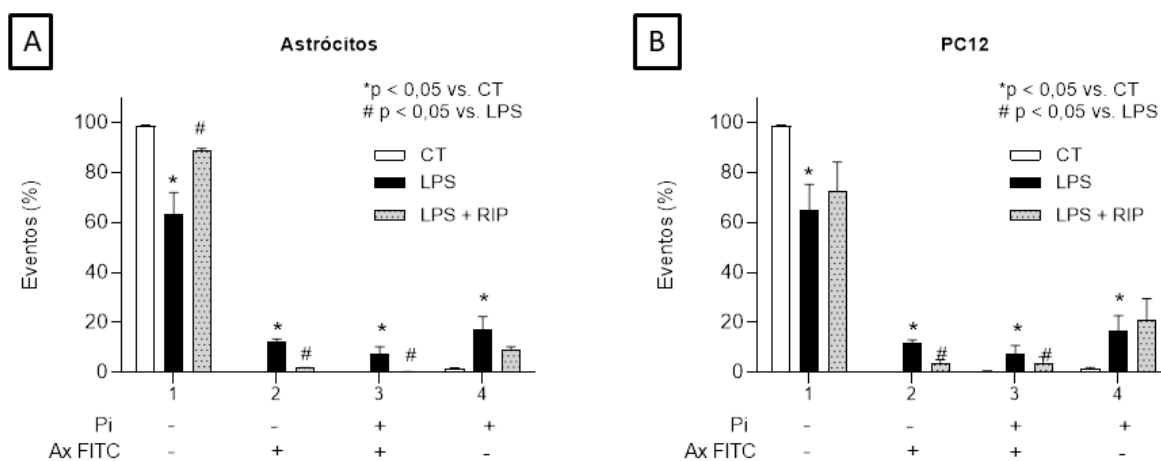
Nas células marcadas apenas com PI (PI +/- Anx -), verificou-se aumento na porcentagem de eventos no grupo LPS ( $18,80 \pm 2,61$ ) quando comparado ao grupo controle ( $2,19 \pm 0,66$ ). A Riparina não foi capaz de reverter esse processo.



Não foi possível obter os gráficos representativos de densidade por limitação técnica.

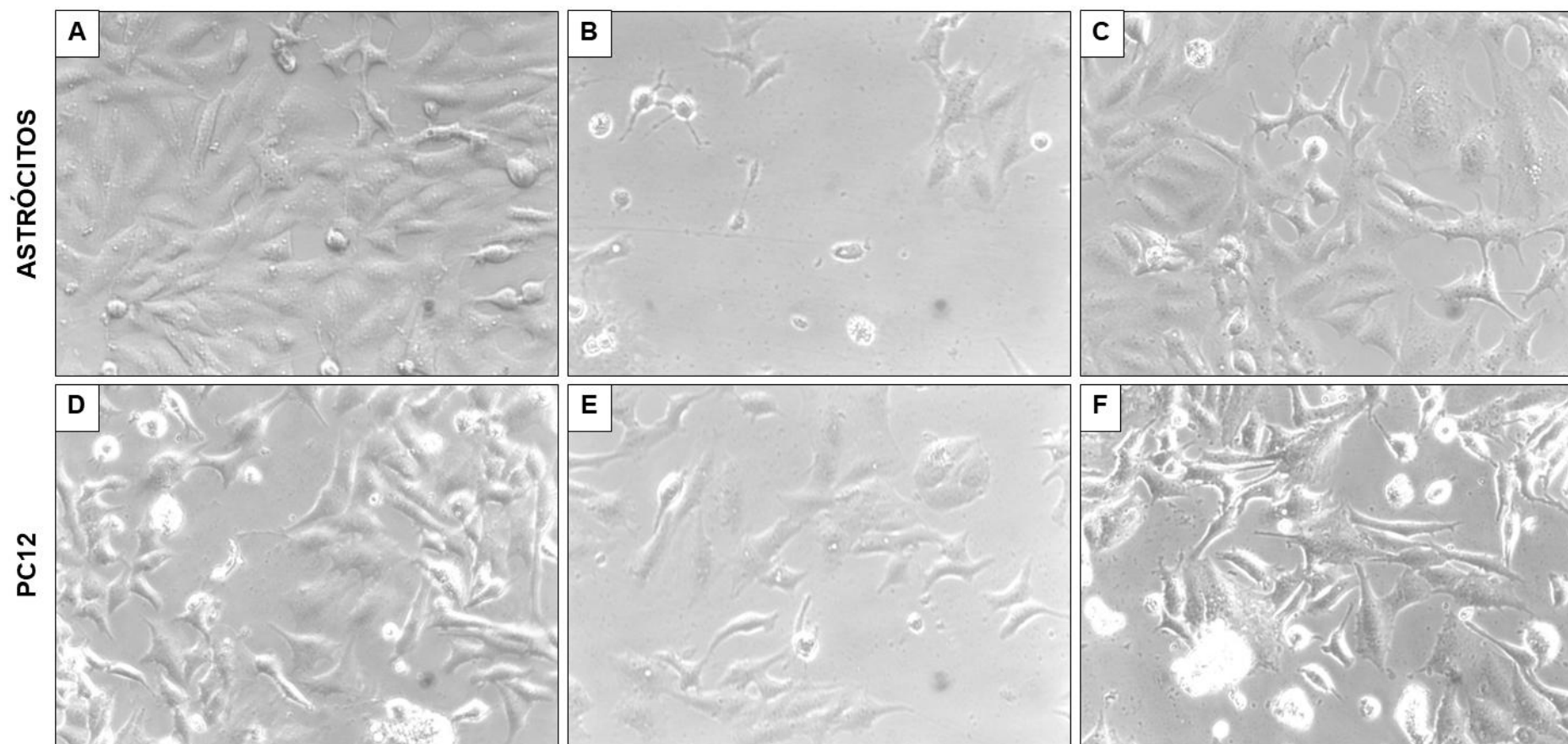
As imagens microscópicas estão expressas na figura 31. O controle demonstra células com morfologia típica, alongadas e bem aderidas, enquanto as células submetidas ao LPS apresentaram redução evidente na densidade celular, perda de prolongamentos e algumas apresentando morfologia arredondada. O tratamento com a Riparina III foi capaz de reverter parcialmente as alterações, onde pode-se observar melhor preservação da morfologia, com células mais aderidas e presença de prolongamentos.

Figura 30 - Avaliação dos mecanismos de morte celular por marcação de Iodeto de Propídio (PI) e Anexina V (Ax) em astrócitos e células PC12 desafiados por LPS e tratadas com Riparina III



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. CT: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo; RIP: Riparina. Onde \*p<0,05 vs. Grupo controle; #p<0,05 vs LPS.

Figura 31 - Representação da morfologia das células PC12 e Astrócitos através da técnica de Microscopia Óptica



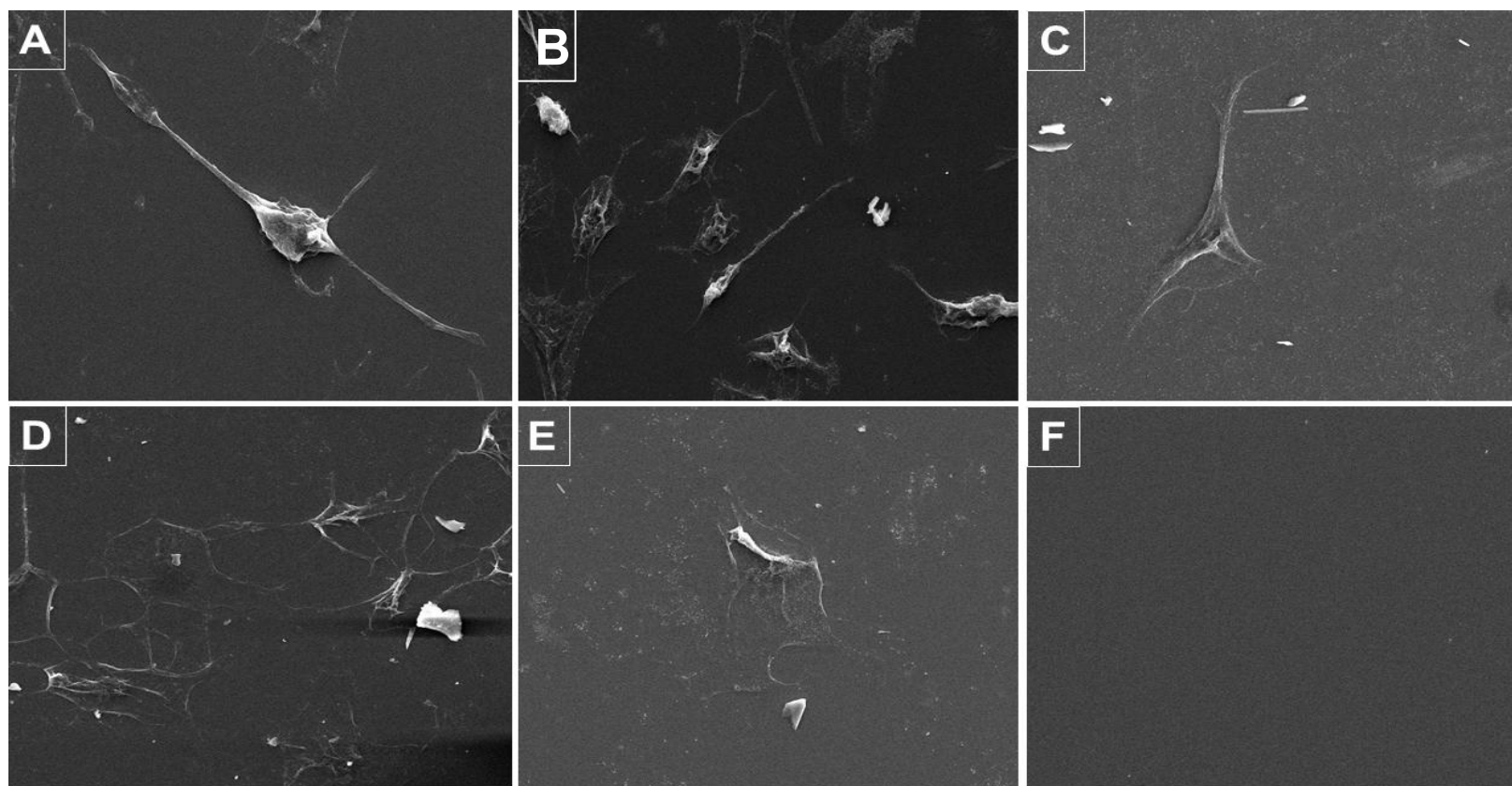
Imagens obtidas com o Microscópio Óptico Nikon eclipse, aumento de 20x. A: Controle em astrócitos sem tratamento; B: Astrócitos ativados com LPS; C: Células com LPS e tratadas com Riparina na concentração de 62,5 $\mu$ M; D: Controle em PC12 sem tratamento; E: PC12 ativados por LPS; F: PC12 ativados por LPS e tratados com Riparina na concentração de 62,5 $\mu$ M.

#### **6.4 Visualização de alterações morfológicas pela MEV induzidas pelo LPS em células PC12 e em astrócitos e os efeitos da Riparina III na reversão**

A Figura 32 ilustra a morfologia das linhagens de PC12 e Astrócitos, capturada por meio de microscopia eletrônica de varredura. O grupo controle de PC12 (Figura 32A) exibe uma célula alongada, semelhante a neurônios, com prolongamentos finos em torno do seu corpo celular, que se encontra bem definido em formato oval, características da sua morfologia. Em contrapartida, a exposição ao LPS (Figura 32B), resulta em perda do formato das estruturas celulares, incluindo perda da formação do corpo celular. A aplicação da Riparina (Figura 32C) demonstra que houve uma remodelação da estrutura, indicando semelhança ao grupo controle.

Em relação aos astrócitos, observa-se na Figura 32D que o grupo controle apresentou múltiplos prolongamentos finos e ramificados, os quais foram desfeitos, em parte, com a exposição ao LPS (Figura 32E).

Figura 32 - Representação da morfologia das células PC12 e Astrócitos através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)



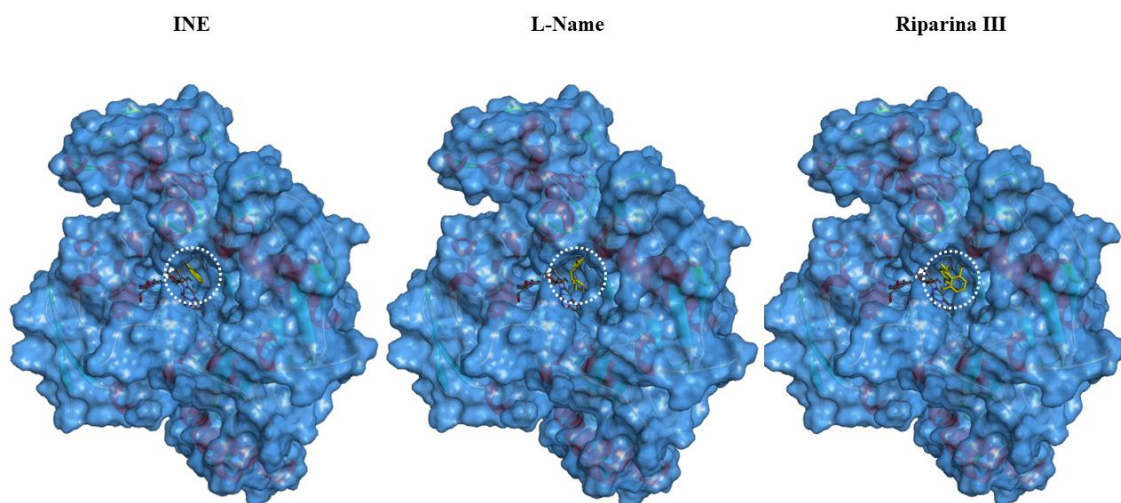
Imagens obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ( $\times 50.000$ ). A: PC12 sem tratamento; B: PC12 ativada por LPS; C: PC12 ativada por LPS e tratada com Riparina na concentração de  $62,5\mu\text{M}$ ; D: Astrócitos sem tratamento; E: Astrócitos ativados por LPS; F: Astrócitos ativados por LPS e tratados com Riparina na concentração de  $62,5\mu\text{M}$ .

## 7 RESULTADOS IN SILICO

### 7.1 Docking Molecular

Após as simulações de docking molecular, foi verificado em qual região da proteína-alvo (iNOS) cada ligante apresentou a melhor pose. A Riparina III e os dois inibidores – INE e L-Name apresentaram ancoragem na mesma região, exatamente no sítio catalítico do substrato L-Arg, conforme a Figura 33.

Figura 33 - Região de ancoragem da melhor pose dos ligantes na proteína-alvo



Legenda: INE – 3-Bromo-7-Nitroindazol; L-Name – N(Gamma)-Nitro-L-arginina metil éster.

Sobre a espontaneidade de cada ancoragem, foi verificado que todos os ligantes apresentaram energia de afinidade mais exergônicas, liberando mais que -6,00 Kcal/mol, sendo a Riparina III com  $\Delta G$  (-7,7 Kcal/mol), demonstrando afinidade semelhante aos dois inibidores conhecidos. Além disso, ao verificar os valores de RMSD, apenas o inibidor L-Name e a Riparina III apresentaram valores abaixo de 2 angstrons (Å), conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Energia de afinidade ( $\Delta G$ ) e RMSD da melhor pose de cada ligante

Ligantes	$\Delta G$ (Kcal/mol)	RMSD*u.b. (Å)
INE (3-Bromo-7-Nitroindazol)	-7,1	3,327
L-Name	-7,0	1,761
Riparina III	-7,7	1,840

\*RMSD *upper bound*.

As características intrínsecas de cada ancoragem foram verificadas a partir dos tipos de interações e suas distâncias entre os resíduos de aminoácidos da proteína-alvo e a estrutura química de cada ligante, conforme a Tabela 5. Foi verificado que os dois inibidores interagiram com resíduos de aminoácidos distintos no sítio catalítico, onde o inibidor INE interagiu com três resíduos: Pro344, Met368 e Trp366, enquanto, o inibidor L-Name interagiu com 9 resíduos: Glu371, Arg382, Asp274, Asp376, Arg260, Tyr341, Trp340, Tyr367 e Gln254. Já a riparina III apresentou interações com três resíduos em comum com os inibidores, sendo Glu371, Arg382 e Pro344.

A capacidade de ancoragem de cada ligante depende do número e, principalmente, do tipo de interação realizada com a proteína-alvo. Desse modo, o inibidor INE realizou três ligações de hidrogênio fortes com os resíduos Met368 e Trp366. Já o inibidor L-Name realizou 9 ligações de hidrogênio, sendo 7 delas consideradas interações fortes com os resíduos Arg382, Arg260, Tyr341, Tyr367 e Gln254, além de uma interação moderada com o resíduo Tyr367 e uma interação fraca com o resíduo Asp274. A Riparina III realizou uma ligação de hidrogênio forte com o resíduo Glu371 e uma ligação de hidrogênio fraca com o resíduo Arg382.

Além dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da proteína-alvo, a presença do grupo Heme contribuiu para a ancoragem dos inibidores e da Riparina III. Dentre os ligantes, a Riparina III realizou um maior número de interações com o grupo Heme, apresentando uma ligação de hidrogênio considerada forte devido sua distância de apenas 1,89 Å.

Tabela 5 - Interações entre os resíduos da proteína-alvo e a estrutura química dos ligantes

Resíduo	INE (3-Bromo-7-Nitroindazol)		L-Name		Riparina III	
	Interação	Distância	Interação	Distância	Interação	Distância
Glu371			Atração de carga	5,14	Ligação de Hidrogênio	2,16
			Atração de carga	4,44		
Arg382			Ligação de Hidrogênio	2,80	Ligação de Hidrogênio	4,70
			Doador-Doador desfavorável	4,23		
			Doador-Doador desfavorável	4,00		
Pro344	$\pi$ -Alquil	4,83			Alquil	4,57
					$\pi$ -Alquil	4,67
					Ligação Carbono- Hidrogênio	3,71
Met368	Ligação de Hidrogênio	3,04				
	Ligação de Hidrogênio	3,10				
Trp366	Ligação de Hidrogênio	2,78				
Asp274			Ligação de Hidrogênio	3,99		
			Atração de carga	5,02		

Asp376			Atração de carga	3,49		
			Atração de carga	3,39		
Arg260			Ligação de Hidrogênio	3,02		
Tyr341			Ligação de Hidrogênio	2,74		
			Ligação de Hidrogênio	2,79		
Trp340			Doador-Doador desfavorável	3,78		
Tyr367			Ligação de Hidrogênio	2,42		
			Ligação de Hidrogênio	3,24		
Gln254			Ligação de Hidrogênio	2,90		
			Ligação de Hidrogênio	2,94		
Heme	$\pi$ -Empilhamento	3,91	$\pi$ -Sigma	3,99	Ligação de Hidrogênio	1,89
	$\pi$ -Empilhamento	5,40			$\pi$ -Alquil	4,16
	$\pi$ -Alquil	4,75	$\pi$ -Sigma	3,61	$\pi$ -Alquil	4,36
					$\pi$ -Alquil	5,12

Distância em angstrom (Å).



A fim de visualizar de forma mais detalhadas os tipos de interações realizadas entre as estruturas químicas dos ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da iNOS, os mapas 2D foram dispostos nas Figuras 34 a 36.

Figura 34 - Mapa 2D das interações entre o inibidor INE e a subunidade A da iNOS

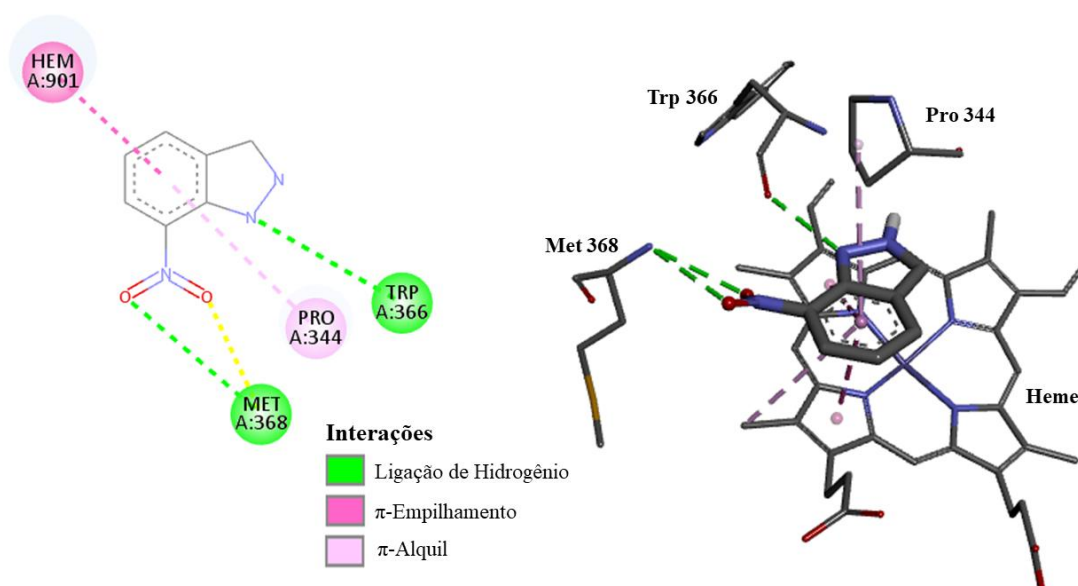


Figura 35 - Mapa 2D das interações entre o inibidor L-Name e a subunidade A da iNOS

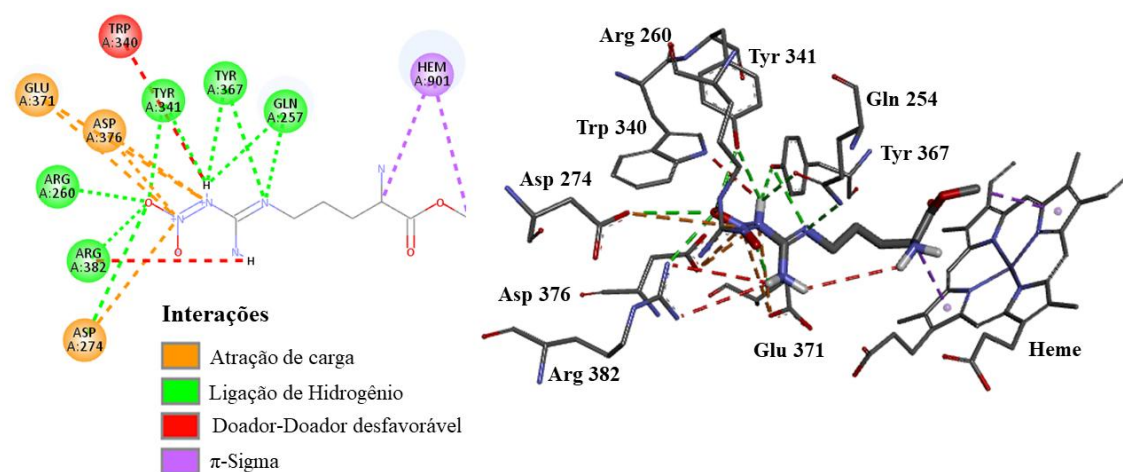
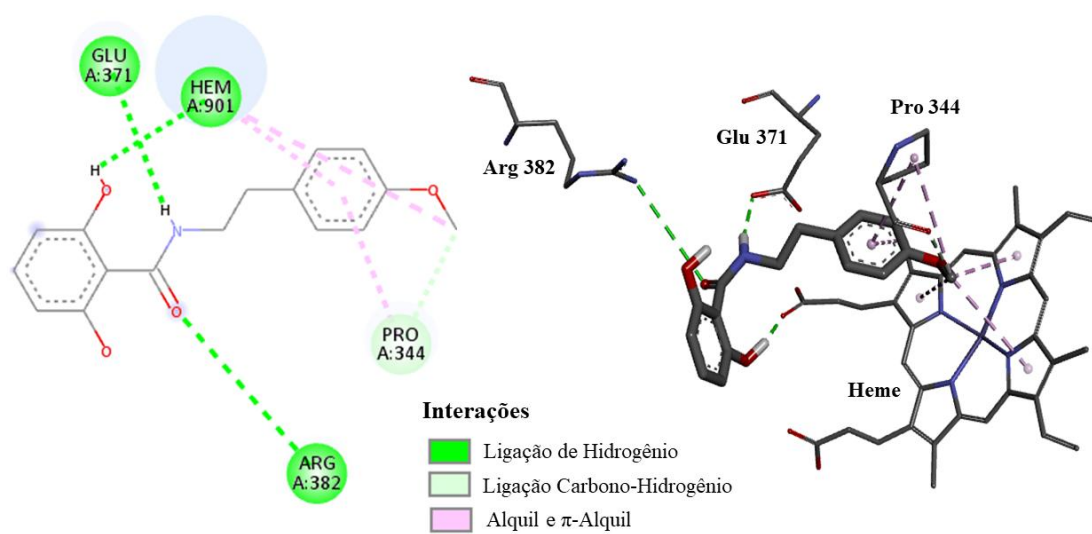


Figura 36 - Mapa 2D das interações entre a Riparina III e a subunidade A da iNOS



## 8 DISCUSSÃO

A depressão representa uma condição debilitante que coloca uma significativa ameaça à saúde humana, afetando milhões de pessoas de todas as faixas etárias. A Organização Mundial da Saúde prevê que a carga de doença da depressão ocupará o primeiro lugar em 2030. Seus mecanismos subjacentes envolvem múltiplos fatores, abrangendo desde desregulação de citocinas, neurotransmissores até sistemas hormonais. De forma notável, os processos inflamatórios têm demonstrado ter um papel central na origem de condições crônicas que podem contribuir para o surgimento da depressão (XU et al., 2023).

Uma crescente quantidade de evidências indica que os distúrbios do sistema nervoso central não se restringem ao tecido cerebral, mas envolvem interações substanciais com os processos inflamatórios no cérebro. Diante dessa informação, também foi comprovado que o lipopolissacarídeo (LPS) tem a capacidade de ativar a micróglia e a astroglia, resultando em uma resposta imunológica estimulada que, por sua vez, desencadeia a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores prejudiciais ao redor dos neurônios. Nessas circunstâncias de estimulação neuroinflamatória intensa, os processos autofágicos são interrompidos, contribuindo significativamente para um aumento na apoptose intraneuronal, associada a comportamentos depressivos (LI et al., 2023).

Embora não seja possível afirmar que todos os transtornos depressivos estão associados à neuroinflamação, isso sugere que os mecanismos inflamatórios do sistema nervoso devem ser considerados como um elemento significativo na gênese da depressão, e a redução da neuroinflamação emerge como uma via de investigação promissora para o tratamento depressivo. Além disso, é essencial identificar novas moléculas com a capacidade de preservar o indivíduo acometido com esse transtorno, ou melhorar seu estilo de vida.

Em estudos anteriores, o grupo de pesquisa do Laboratório de Neuropsicofarmacologia já havia evidenciado o potencial neuroprotetor da Riparina III em um modelo de depressão, abordando outras hipóteses (MALLMANN et al., 2021). Portanto, decidimos investigar mais aprofundada o mecanismo por trás do efeito benéfico da Riparina III em um modelo in vivo e in vitro de depressão-símile por LPS,

com implicações relevantes para o entendimento da sua possível aplicação na depressão.

O modelo experimental utilizado neste estudo já é bem descrito na literatura, e vem sendo bastante utilizado como forma de mimetizar o efeito da inflamação crônica no organismo, com os processos envolvidos (LI et al., 2021; MELLO et al., 2021a; SUN et al., 2023). Assim, foram utilizados a linhagem “black” de animais, selecionados especificamente por serem isogênicos, ou seja, compartilham uma linhagem genética comum, sendo vantajoso para experimentos que requerem consistência e reprodução de resultados. Para os estudos *in vitro*, utilizou-se linhagens de células que desempenham um papel fundamental na neuroinflamação.

Em seguida, ao final do protocolo, foi analisada a atividade da Riparina III sobre testes preditivos de alterações neurocomportamentais. Observou-se os efeitos benéficos dessa substância no Teste do Nado Forçado, revertendo a imobilidade causada pelo LPS. Vale destacar que esse teste é padronizado e permite uma reprodutibilidade robusta nos resultados, permitindo a investigação de substâncias com possível atividade antidepressiva. Com isso, fundamentado na ideia de que a imobilidade reflete uma manifestação de desespero comportamental, o aumento da expressão da imobilidade é associado a estados emocionais relacionados à desesperança e desamparo (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1978).

Estudos anteriores com a Riparina III já evidenciaram sua capacidade de reduzir a imobilidade no teste de nado forçado (MALLMANN et al., 2021; VASCONCELOS et al., 2015). Nesse contexto, mais uma vez, podemos reforçar sua possível atividade antidepressiva, agora no modelo de depressão-símile induzida por LPS, uma vez que já é conhecido por seu efeito de aumentar a imobilidade, como previamente comprovado em pesquisas (MELLO et al., 2021a; WU et al., 2023). Importante salientar que a Riparina III promoveu melhora comportamental comparável ao escitalopram, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina amplamente utilizado e validado clinicamente para o tratamento da depressão.

No âmbito de testes comportamentais, sabe-se que um único teste comportamental não é abrangente o bastante para reproduzir todos os sintomas da depressão. No entanto, ele proporciona uma abordagem controlada para avaliar as respostas comportamentais dos animais, oferecendo visões esclarecedoras sobre os mecanismos subjacentes. Dessa forma, esse resultado foi aprimorado ao incluir outro

teste preditivo de depressão, o teste de preferência por solução de sacarose, a fim de corroborar a eficácia da substância em mitigar os efeitos do LPS.

A anedonia, avaliada por meio do teste da preferência por sacarose, assume um papel central e distintivo no contexto da depressão. Este sintoma descreve a percepção de falta de interesse ou prazer em atividades e experiências anteriormente satisfatórias. Para classificar a depressão como um "episódio depressivo maior", é fundamental que o indivíduo manifeste tanto um estado de humor deprimido quanto anedonia, acompanhados por outros sintomas, ao longo de um período de pelo menos duas semanas. Este sintoma abrange uma gama de processos ligados à busca por recompensas (motivação apetitiva), a resposta a estímulos recompensadores (sensibilidade à recompensa) e a habilidade de aprender com as recompensas para otimizar comportamentos futuros (aprendizado por reforço) (PERKOVIC; PECHENKOV, 2023; RUTHERFORD; MCDOUGLE; JOORMANN, 2023). Isso justifica o uso do teste de preferência por sacarose, onde o açúcar atua como estímulo.

Foi estabelecido por evidências que tanto a inflamação aguda quanto a crônica podem diminuir a motivação por recompensas, e que a mensuração do grau de anedonia e sintomas depressivos pode ser viabilizada por meio da avaliação da preferência por solução de sacarose. Neste contexto, investigou-se previamente o impacto do LPS, cujos resultados corroboram com nossos achados (BOYLE et al., 2023; KONG et al., 2023). Nesse cenário, constatou-se que a Riparina III teve um efeito benéfico ao reverter essa redução na preferência por sacarose induzida pelo LPS. Este resultado é de grande relevância, uma vez que sugere uma possível interação da Riparina III com o sistema dopaminérgico, uma associação já previamente demonstrada em outras pesquisas (MELO et al., 2013).

Nesse teste, o escitalopram não apresentou efeito significativo na reversão da redução da preferência por sacarose induzida pelo LPS, possivelmente devido à sua ação predominantemente serotoninérgica, que pode não ser suficiente para restaurar alterações dopaminérgicas associadas à anedonia induzida por inflamação (FELGER; MILLER, 2012). Além disso, é possível que o protocolo de tratamento utilizado, em termos de duração e dose, tenha sido insuficiente para promover mudanças comportamentais significativas nesse modelo específico.

A análise aprofundada dos diversos fatores que podem influenciar estados emocionais alterados é de extrema importância. Na prática clínica, é frequente

observar a simultaneidade de um transtorno depressivo e a presença de sintomas de ansiedade, que, quando coexistem, podem significativamente prejudicar a qualidade de vida dos indivíduos e aumentar o risco de desenvolver comorbidades graves, como doenças cardiovasculares, suicídio e mortalidade precoce (ETTMAN; GOICOECHEA; STUART, 2023; HOHLS et al., 2021).

Assim, procedeu-se à avaliação dos efeitos da Riparina diante da indução de comportamento semelhante à ansiedade causado pelo LPS, um agente já empregado em estudos anteriores para provocar respostas ansiogênicas. Além disso, sabe-se que um aumento nos marcadores inflamatórios pode incitar respostas de ansiedade em modelos animais (MATSUMOTO et al., 2021; SABEDRA SOUSA et al., 2019; SULAKHIYA et al., 2016). Em associação, foi analisado a capacidade exploratória e de locomoção dos animais, que podem estar associadas a prejuízo na cognição ou comprometimento neuromuscular (BINEY et al., 2022; PATEL et al., 2016).

Para tal propósito, recorreu-se ao emprego do teste do campo aberto associando com todos os parâmetros citados previamente; do teste da placa perfurada, um paradigma reconhecido por analisar respostas ansiogênicas; e do labirinto em cruz elevada, a fim de mensurar a reação de um modelo animal a um ambiente desconhecido e avaliar os efeitos de substâncias com propriedades ansiolíticas.

Assim, foi confirmado uma baixa capacidade de locomoção ou exploração pelo LPS, confirmada pelo menor número de cruzamentos e da distância percorrida, semelhante a um estudo (SUN et al., 2020). Em contrapartida, não se pode afirmar que a Riparina III promoveu o mesmo efeito, uma vez que a mesma não foi administrada de forma isolada. Além disso, estudos prévios já demonstraram que ela não alterou a atividade locomotora dos animais, comprovada em testes de campo aberto, rota rod e placa perfurada (MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2004).

Outro parâmetro de grande relevância, avaliado por meio do teste de campo aberto, está relacionado ao comportamento preditivo de ansiedade, o qual se manifesta pelo aumento do tempo gasto na região periférica em comparação com a área central, como destacado por Vasović et al. (2023). Além disso, nosso estudo englobou a análise do número de entradas na zona central, a capacidade de exploração desta área (medida pelo total de cruzamentos) e o tempo despendido nela. A diminuição desses índices provocada pela administração de LPS evidencia um comportamento ansioso, corroborando com achados anteriores em pesquisas similares (JING et al., 2019; MOREIRA et al., 2023; ZHENG et al., 2021).

Por outro lado, o aumento do tempo gasto na zona central e a diminuição da tigmotaxia pela Riparina III demonstra uma reversão desse parâmetro. Este comportamento é caracterizado pela preferência do animal por buscar abrigo em vez de se expor à área aberta e aversiva (MOREIRA et al., 2023). Em outras palavras, um animal submetido a estresse tende a permanecer próximo às paredes e evitar o centro relativamente exposto da área aberta, demonstrando uma menor propensão à exploração do ambiente novo (ZHANG et al., 2023). No entanto, a Riparina III contrapõe esse padrão, indicando um efeito potencialmente ansiolítico ou de redução do estresse.

A capacidade do LPS de induzir um comportamento semelhante ao de ansiedade em camundongos também foi corroborada pelos resultados obtidos nos testes da placa perfurada e do labirinto em cruz elevada, que coincidem com descobertas anteriores de outros pesquisadores (BABAEI et al., 2022; GAO et al., 2020). No entanto, a Riparina III demonstrou a capacidade de reverter esse comportamento, indicando atividades semelhantes em modelos relacionados à depressão e ansiedade (MALLMANN et al., 2021; SOUSA et al., 2004).

Outra condição comórbida frequentemente associada à depressão, e estreitamente relacionada aos danos neuronais induzidos pelo LPS, é o déficit de memória. Como destacado por Kshirsagar et al. (2021), os distúrbios neurodegenerativos são caracterizados por uma deterioração gradual e degeneração dos neurônios do sistema nervoso central, o que resulta em uma característica comum de comprometimento da capacidade de memória. Além disso, a inflamação tem sido reconhecida como um fator significativo para desencadear esses prejuízos cognitivos (HAKIMI et al., 2020).

Os fatores pró-inflamatórios liberados durante o processo inflamatório conseguem penetrar no cérebro e ativar as células endoteliais do líquido cefalorraquidiano, que expressam receptores para citocinas. Quando as citocinas pró-inflamatórias estão em níveis elevados, especialmente na região do hipocampo, isso acarreta prejuízos na plasticidade sináptica, no aprendizado e na memória. Além disso, a associação com a produção de agentes neurotóxicos, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e NO, pode causar danos aos neurônios, podendo até matá-los (HAKIMI et al., 2020).

Neste contexto, foi investigado o potencial da Riparina III em atenuar os efeitos do LPS no déficit de memória por meio do Teste do Labirinto em Y. Esse teste é fundamentado principalmente na avaliação da memória de curto prazo e espacial,

funções controladas primariamente pela região do hipocampo no cérebro (KSHIRSAGAR et al., 2021).

A influência do LPS no comprometimento da memória foi firmemente estabelecida neste estudo, o que está em consonância com outros achados documentados na literatura (KSHIRSAGAR et al., 2021; SADRAIE et al., 2019; THINGORE; KSHIRSAGAR; JUVEKAR, 2021a). Notavelmente, a administração de Riparina III neste contexto resultou em um aumento significativo no número de sequências corretas observadas no teste do labirinto, semelhante a um outro estudo realizado em modelo de corticosterona (VASCONCELOS, 2015). Esses resultados sugerem uma notável melhoria na memória espacial, na capacidade de aprendizado e na cognição. É possível que esses benefícios estejam relacionados à manutenção de níveis adequados de acetilcolina no cérebro, com ênfase especial no hipocampo, uma área conhecida por seu papel crucial na formação e na preservação das memórias (KSHIRSAGAR et al., 2021).

Torna-se evidente, portanto, que a perspectiva futura da utilização da Riparina III em pesquisas clínicas é promissora, uma vez que sua atividade antidepressiva não apenas se comprovou eficaz na reversão das alterações comportamentais causadas pelo LPS, mas também demonstrou efeitos benéficos em relação à memória, anedonia e ansiedade. Esses resultados sugerem um amplo potencial terapêutico dessa substância, indicando possíveis aplicações em intervenções clínicas para transtornos que envolvem esses aspectos do comportamento e da cognição.

Ao considerarmos que a depressão está associada não apenas a alterações comportamentais, mas também a mudanças neuroquímicas que refletem os variados mecanismos fisiopatológicos e áreas cerebrais envolvidas, a análise dos níveis de nitrito emerge como um componente crucial a ser investigado entre os mecanismos propostos para explicar essas alterações no contexto da neuroinflamação causada pelo LPS.

O óxido nítrico (NO) exerce uma função como um radical livre, podendo ser potencialmente prejudicial aos tecidos cerebrais, o que lança luz sobre seu possível envolvimento nas disfunções cognitivas. Além disso, há relatos de que durante episódios de neuroinflamação, são gerados níveis elevados de NO, estabelecendo uma possível ligação entre a neuroinflamação e distúrbios cerebrais, como a depressão (BEHESHTI et al., 2020).



De extrema relevância para este estudo, o sistema de óxido nítrico (NO) foi examinado neste modelo através da dosagem de nitrito, uma vez que já foi estabelecido que os níveis deste marcador tendem a aumentar em modelos animais de neuroinflamação induzida pelo LPS (ARSHAD; AHMAD; LODHI, 2022; MOREIRA et al., 2023). A elevação dos níveis de moléculas oxidativas e nitrosativas representa uma ameaça significativa para os neurônios, pois essas substâncias têm o potencial de causar danos consideráveis. Isso é especialmente preocupante porque o cérebro apresenta concentrações antioxidantes relativamente mais baixas em comparação com outros órgãos, tornando-o particularmente suscetível aos efeitos prejudiciais dos radicais livres (INSERRA et al., 2019).

No contexto desta análise, como já observado em estudos anteriores, a administração de LPS resultou em um aumento significativo dos níveis de nitrito nas amostras cerebrais avaliadas, sugerindo a possibilidade de dano oxidativo e geração de radicais livres. Importante notar que esse efeito prejudicial ocorreu em regiões cerebrais de grande relevância para a função cognitiva, aprendizado e memória. Por outro lado, o tratamento com Riparina III demonstrou a capacidade de atenuar o estresse oxidativo induzido pelo LPS em todas as áreas cerebrais estudadas, indicando um potencial efeito protetor dessa substância contra os danos oxidativos no cérebro.

Essa ação da Riparina III foi mais pronunciada do que a observada com o escitalopram no córtex pré-frontal. Esse resultado sugere que, diferentemente do escitalopram, cujo efeito principal é mediado pela modulação serotoninérgica, a Riparina III pode exercer ação neuroprotetora direta sobre vias relacionadas ao estresse oxidativo e à inflamação, conferindo-lhe um perfil mais amplo de atuação em modelos neuroinflamatórios.

Outro aspecto neuroquímico analisado neste estudo foi a peroxidação lipídica, medida pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), considerado um marcador consolidado de estresse oxidativo, frequentemente associado a danos celulares em modelos de neuroinflamação (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019). Nossos resultados demonstraram que a administração de LPS promoveu um aumento significativo nos níveis de TBARS tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal, confirmando o envolvimento do estresse oxidativo na neurotoxicidade induzida por endotoxinas bacterianas (THINGORE; KSHIRSAGAR; JUVEKAR, 2021b). Esse resultado é particularmente importante, uma vez que o

córtex pré-frontal e o hipocampo estão diretamente envolvidos na regulação do humor e nos processos de memória — funções que costumam estar prejudicadas em quadros de depressão (DIXSAUT; GRÄFF, 2021; GUNUC; KOYLU, 2023b).

O tratamento com Riparina III foi eficaz em reverter significativamente esse aumento nos níveis de TBARS nas duas regiões analisadas, demonstrando sua capacidade de atenuar o dano oxidativo promovido pelo LPS. Este efeito antioxidante reforça achados prévios sobre a Riparina III, que já haviam sugerido sua atuação na redução da produção de espécies reativas de oxigênio e na inibição de vias pró-oxidativas (MALLMANN et al., 2021; VASCONCELOS et al., 2015).

Interessantemente, o escitalopram também promoveu uma redução nos níveis de TBARS, embora de menor magnitude do que a Riparina. Isso pode ser explicado pelo fato de que os inibidores seletivos da receptação de serotonina possuem efeitos menos robustos e mais lentos em alguns modelos inflamatórios.

Portanto, os resultados sugerem que a Riparina III apresenta uma atividade antioxidante superior ou mais imediata que o escitalopram. A capacidade da Riparina III em restaurar os níveis de peroxidação lipídica a valores próximos ao grupo controle reforça seu potencial como agente neuroprotetor, com benefícios que podem extrapolar os efeitos serotoninérgicos dos antidepressivos tradicionais, atuando diretamente sobre vias redox cerebrais.

Apesar de o LPS ser conhecido por induzir estresse oxidativo e consumir antioxidantes intracelulares, quando analisou os níveis de glutathiona reduzida (GSH), não houve dados significativos, ou não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal. Um dos fatores que pode ter contribuído para esse resultado foi o tempo de experimento, que pode não ter sido suficiente para capturar uma depleção significativa de GSH, ou, alternativamente, pode ter ocorrido uma recuperação parcial dos níveis intracelulares, especialmente se o insulto oxidativo não foi suficientemente prolongado. Outro ponto relevante é que, no dia que o experimento foi feito, houve problemas com o sistema de ar-condicionado no laboratório, e as amostras foram expostas a muito calor. O que pode ter dado erro nos testes.

Adicionalmente, a ausência de efeito significativo sobre a GSH não invalida o potencial antioxidante da Riparina III, mas sugere que seus mecanismos de proteção podem atuar prioritariamente na contenção da oxidação de lipídios e proteínas, e não necessariamente na modulação direta da glutathiona.

É importante ressaltar que muitos pesquisadores argumentam que a produção elevada de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo estão intrinsecamente relacionados. O aumento na geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) resulta no dano oxidativo de várias estruturas celulares, bem como na liberação de sinais de alerta (DAMP), que por sua vez iniciam respostas inflamatórias e desencadeiam a ativação da micróglia. Uma vez ativada, a micróglia produz tanto citocinas pró-inflamatórias quanto ERO. Esse ciclo prejudicial, no qual as ERO geradas induzem o estresse oxidativo, sustenta a contínua ativação da micróglia e, conseqüentemente, aumenta ainda mais os níveis de ERO (AL-AMIN et al., 2018; JAZVINŠČAK JEMBREK et al., 2023; PENG et al., 2021; SHARMA; NEHRU, 2015).

Essas informações fornecem uma base sólida para uma investigação mais aprofundada desta via, incluindo uma análise mais detalhada dos níveis de citocinas neste modelo, e conseqüentemente a produção de outras moléculas neurotóxicas, como o iNOS, que em excesso, pode atuar como um poderoso oxidante (JAZVINŠČAK JEMBREK et al., 2023).

No que diz respeito a análise de citocinas no modelo *in vivo*, observou-se que a administração de LPS promoveu alterações regionais distintas nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6, com aumento significativo de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal, mas não no hipocampo, e redução de IL-6 no hipocampo e córtex pré-frontal, demonstrando resultados bem contraditórios.

O tratamento com Riparina III modulou de forma não uniforme as citocinas, com elevação de IL-1 $\beta$  e IL-6 em algumas condições, contrastando com relatos prévios de efeitos anti-inflamatórios em modelos crônicos de depressão por corticosterona (MALLMANN et al., 2021b). Essa divergência pode refletir um efeito dependente do contexto, em que a Riparina III atue como imunomodulador, podendo potencializar ou atenuar a inflamação conforme a via molecular envolvida e o estado basal do tecido. De modo semelhante, a dexametasona apresentou perfil paradoxal. Em contrapartida, o escitalopram reduziu IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal, resultado compatível com estudos que mostram efeito anti-inflamatório de inibidores de recaptação de serotonina sobre citocinas pró-inflamatórias (HANNESTAD; DELLAGIOIA; BLOCH, 2011).

Esses achados reforçam a ideia de que a resposta neuroimune a um estímulo periférico é multifatorial e depende de variáveis como região cerebral, tempo de exposição, tipo de estímulo e natureza do fármaco. Além disso, o número de amostras cerebrais utilizados neste estudo foram pequenas, e houve contratempos não

previstos no laboratório, como problemas no ar-condicionado, deixando as amostras sob influência da temperatura elevada.

Além desses efeitos promissores no modelo *in vivo*, estender a análise da neuroinflamação para incluir o efeito em células de astrócitos e PC12 é fundamental para uma compreensão mais completa dos processos inflamatórios no sistema nervoso e de seu impacto na saúde cerebral. Dessa forma, também analisamos o efeito da Riparina III nessas células.

No ensaio do MTT, as células tratadas com Riparina III demonstraram uma redução na viabilidade celular apenas nas concentrações mais elevadas nas células PC12 e astrócitos, resultando na exclusão dessas concentrações de ensaios subsequentes. Apesar da limitada quantidade de estudos envolvendo essa substância em modelos *in vitro*, e a ausência de estudos em células neuronais, Oliveira-Júnior et al (2020) observaram que a Riparina III exibe baixa toxicidade em suas investigações.

Avaliando os efeitos da Riparina III em resposta à atividade do LPS nessas células, observou-se que duas concentrações mantiveram um perfil de viabilidade semelhante ao grupo controle, indicando que essas células conseguiram manter sua sobrevivência mesmo sob a influência do LPS. Além disso, as células expostas ao LPS mostraram um aumento aparente na viabilidade, o que sugere que esta endotoxina possa ter ativado os astrócitos no estado A1. Esse estado está associado a uma resposta inflamatória acentuada e à liberação de moléculas pró-inflamatórias, o que pode contribuir para a lesão neuronal (LI et al., 2023).

Em um estudo recente conduzido por Dos Santos et al. (2023), que envolveu a exposição de células neuronais PC12 ao meio condicionado de micróglia, foi observado um aumento na viabilidade celular. Esses resultados indicam que o LPS desencadeou uma proliferação das células microgliais. No entanto, também foi notado um aumento no estado inflamatório das células.

De maneira semelhante, em um estudo anterior conduzido por YE et al. (2013), foi demonstrado que a exposição ao LPS promoveu significativamente a proliferação das células BV-2 e aumentou a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , pela micróglia. No entanto, é importante ressaltar que o sobrenadante resultante dessas condições também indicou a ocorrência de apoptose ou neurose celular.

Nesse sentido, em vez de promover a proliferação ou a viabilidade celular, o LPS tende a ativá-las para um estado inflamatório, desencadeando uma resposta

prejudicial no cérebro. Resultados semelhantes foram observados no contexto de isquemia cerebral em tecidos do hipocampo (LI et al., 2023). Portanto, esses achados destacam a necessidade de uma análise mais aprofundada da neuroinflamação induzida pelo LPS, como por meio do teste de PI (Iodeto de propídio) e Anexina V, a fim de avaliar como as células neuronais ou gliais respondem à inflamação. Isso pode fornecer informações cruciais para determinar se a exposição ao LPS resulta na morte celular (apoptose ou necrose) ou se as células conseguem manter sua viabilidade em condições inflamatórias.

Dessa forma, foi avaliado, por meio de citometria de fluxo, o efeito da Riparina III sobre a viabilidade celular em astrócitos e células PC12 expostas ao LPS. Observou-se que a exposição ao LPS provocou danos celulares significativos em ambas as linhagens, evidenciados pelo aumento da marcação por iodeto de propídio (PI) e anexina V — indicadores de necrose e apoptose, respectivamente (KUMAR; SANEJA; PANDA, 2021).

Nesse contexto, sabe-se que o LPS pode desencadear processos neurodegenerativos tanto pela ativação de vias apoptóticas, que elevam a marcação com anexina V, quanto pela indução de necrose, geralmente mediada pela ativação do receptor Toll-like 4, que resulta em maior entrada de PI nas células comprometidas (ABD ELMAABOUD et al., 2023; Muhammad et al., 2019).

Por outro lado, as células tratadas com Riparina III na concentração de 62,5  $\mu$ M, após exposição ao LPS, apresentaram redução significativa na marcação com ambos os marcadores, sugerindo um efeito citoprotetor da substância. Esses achados indicam que a Riparina III exerce ação antiapoptótica e antinecrótica, atenuando os danos celulares induzidos pelo LPS. Resultados semelhantes foram observados por Mallmann et al. (2021) em modelo in vivo, onde o tratamento com Riparina III reduziu significativamente os níveis de interleucina-2 (IL-2), uma citocina pró-inflamatória associada à inibição da diferenciação neuronal, prejuízos na transmissão sináptica e indução de apoptose.

O efeito da Riparina III também foi examinado por meio da citometria de fluxo, utilizando a rodamina123 como indicador de estresse nas mitocôndrias. Essa análise foi conduzida devido à relevância das mitocôndrias na função celular. Elas não só desempenham um papel fundamental como a "usina de energia" da célula, produzindo ATP, mas também têm influência na regulação da síntese de ATP, na geração de ERO, na gestão intracelular de cálcio e na apoptose. Além disso, a disfunção

mitocondrial é um mecanismo fisiopatológico central em várias doenças (Li et al., 2022b).

Neste estudo, demonstramos que a exposição ao LPS resultou em disfunção mitocondrial, evidenciada pela redução da retenção de rodamina123. Isso pode levar a uma diminuição na produção de ATP e ao aumento das ERO nas mitocôndrias. Por outro lado, observamos uma melhora nesse indicador quando a Riparina III foi introduzida, indicando um potencial benefício em preservar a função mitocondrial. Essa descoberta é particularmente relevante, considerando a importância da manutenção de uma função mitocondrial saudável, especialmente em tecidos com alta demanda energética, como o cérebro.

Como relatado por Song et al. (2023), os neurônios, devido à sua alta taxa metabólica, são particularmente suscetíveis a problemas nas mitocôndrias. Em modelos de pesquisa pré-clínicos relacionados à depressão, observa-se alterações na expressão de genes ligados às mitocôndrias, danos em proteínas e lipídios das membranas mitocondriais, interrupção na cadeia de transporte de elétrons, aumento do estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose. Estes mesmos parâmetros também podem ser identificados no cérebro de pacientes com depressão. Portanto, a preservação do número, forma e função das mitocôndrias, é essencial para a sobrevivência e funcionamento adequado das células.

Ao examinar as mudanças na morfologia celular usando microscopia eletrônica de varredura, com o objetivo de identificar possíveis alterações estruturais induzidas pelo LPS e avaliar os efeitos da Riparina III, observou-se que as células expostas ao LPS apresentaram distorções no formato das estruturas celulares, incluindo perda de integridade do corpo celular. Essas mudanças são indicativas de uma resposta inflamatória e estresse celular, que podem resultar em danos celulares e até mesmo em apoptose (morte celular programada). De maneira significativa, a Riparina III demonstrou a capacidade de reverter parcialmente essas alterações nas células PC12, sugerindo um potencial efeito antiapoptótico.

Com o intuito de esclarecer o mecanismo de ação da Riparina III, conduzimos um estudo de *docking* molecular para investigar a interação molecular entre essa substância e a iNOS. Devido aos resultados promissores previamente obtidos em relação aos níveis de nitrito, decidimos aprofundar nossa análise nessa via específica. Nosso objetivo era obter uma compreensão mais abrangente sobre como a Riparina III influencia a atividade da iNOS e, conseqüentemente, a produção de NO. Essa

compreensão é essencial para a identificação de alvos moleculares potenciais e das vias de sinalização subjacentes que desempenham um papel na resposta à Riparina III.

É conhecido que níveis elevados de NO são observados no sistema nervoso central de pacientes com condições inflamatórias e neurodegenerativas. Esse composto é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Normalmente, a iNOS não é expressa em condições normais. No entanto, em situações neurotóxicas e neuroinflamatórias, a sua expressão é induzida em astrócitos ativados. O NO liberado pela iNOS afeta adversamente os níveis de ATP e inibe a liberação de glutamato, resultando na inibição da respiração mitocondrial. Isso sugere que a iNOS desempenha um papel neurotóxico (KO et al., 2018).

Ao analisar a afinidade da Riparina III com dois inibidores previamente conhecidos, o 3-Bromo-7-nitroindazol (INE) e a N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), observou-se que todos os ligantes apresentaram boa energia de ligação, e com poucas diferenças entre eles (-7,1; -7,0; -7,7, respectivamente), onde a Riparina III obteve melhor desempenho, com energia satisfatória e superior, indicando uma reação mais espontânea.

Além disso, a análise revelou valores de RMSD relativamente baixos, semelhantes aos observados com o L-NAME e superiores aos do INE. Esses resultados apontam para uma melhor sobreposição entre o ligante e a iNOS, indicando uma previsão de docking mais precisa e estável, o que sugere uma maior capacidade de posicionar o ligante na posição correta de maneira eficaz (YADAV; CHOWDHURY, 2022).

A Riparina III, de forma semelhante aos inibidores L-NAME e INE, estabeleceu interações com três resíduos cruciais que compõem o sítio ativo da enzima, nomeadamente Glu371, Arg382 e Pro344. A capacidade dos inibidores de iNOS está em concordância com sua capacidade de influenciar a posição desses aminoácidos essenciais (KHALLAF et al., 2021; ZHANG et al., 2012).

Também houveram ligações de hidrogênio, especialmente com o Glu371 e o Arg382, sendo esse primeiro mais forte, evidenciada pela curta distância de 2,16 Å (IMBERTY et al., 1991). É amplamente conhecido que a interação com esse aminoácido desempenha um papel fundamental no sítio ativo da iNOS, influenciando sua atividade catalítica. Essa interação é considerada um passo crucial para induzir

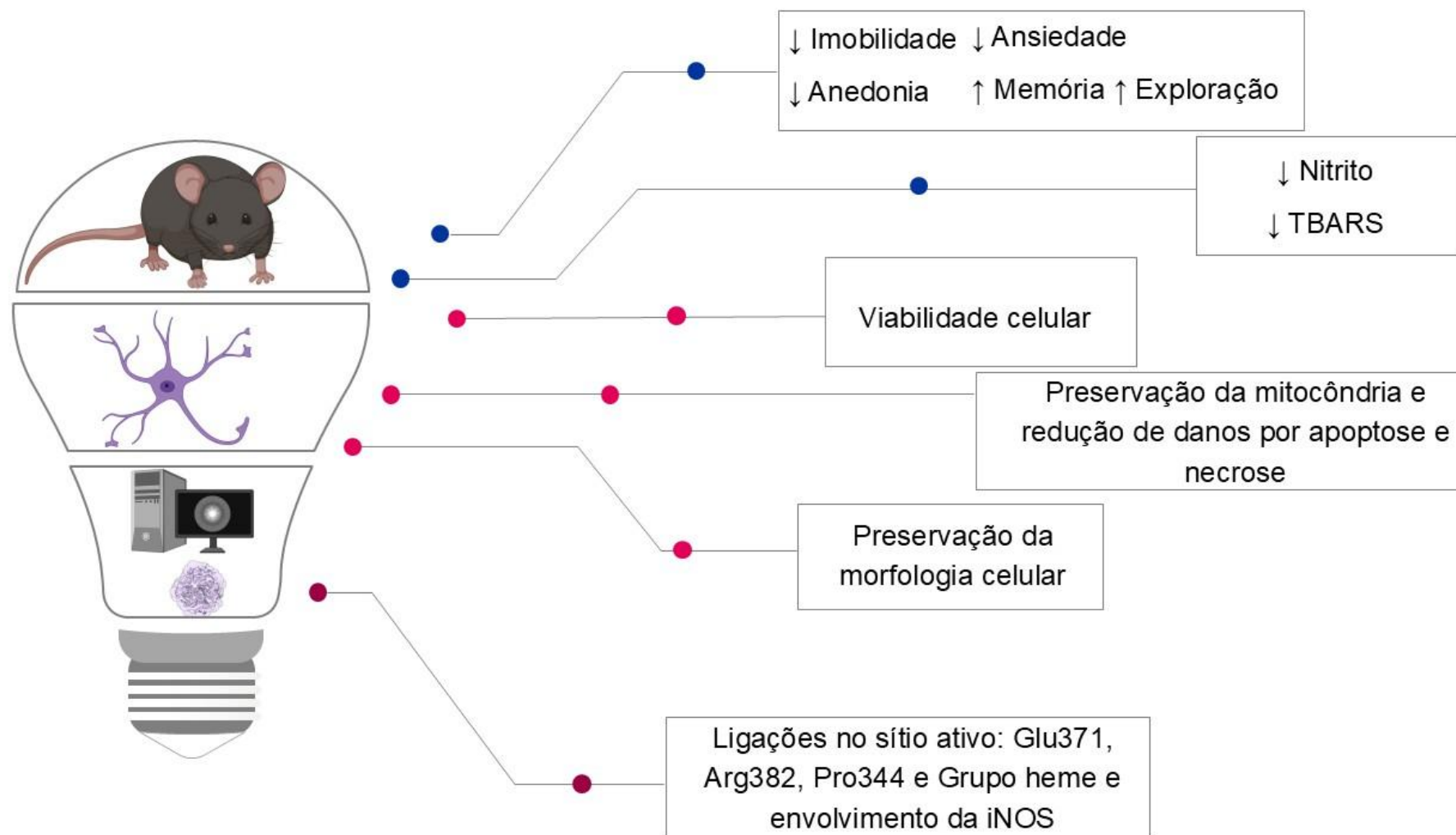
uma mudança conformacional necessária para a inibição eficaz da iNOS (ROSENFELD et al., 2002; SALEM et al., 2023).

Além dessa ligação, a Riparina III demonstrou uma forte interação por meio de ligações de hidrogênio com o grupo Heme, bem como uma interação por  $\pi$ -alquil. O grupo Heme é uma estrutura crucial localizada na região ativa da iNOS e desempenha o papel de sítio catalítico, onde ocorrem as reações químicas para a produção de NO (STUEHR et al., 2004; TEJERO et al., 2019). Essas interações sugerem que a Riparina III pode competir diretamente com o substrato L-arginina pelo sítio ativo da iNOS, potencialmente afetando a atividade catalítica da enzima.

Os resultados apresentados neste estudo contribuem significativamente para o entendimento da neuroinflamação induzida por LPS e destacam o notável potencial antidepressivo da Riparina III. Observamos efeitos positivos em uma ampla gama de comportamentos relacionados à depressão, incluindo anedonia, exploração, ansiedade e memória, além de uma redução marcante no estresse nitrosativo. Essa capacidade parece estar intrinsecamente ligada à capacidade da Riparina III de inibir os processos inflamatórios associados à depressão, comprovada pela reversão de danos em células PC12 e astrócitos. Além disso, nossa abordagem molecular de docking sugere que a ação da Riparina III está relacionada à modulação da via da iNOS, embora sejam necessários estudos adicionais para uma compreensão mais profunda de seu mecanismo de ação. Estes achados encontram-se resumidos no mapa mental abaixo (Figura 37).



Figura 37 - Mapa mental resumido dos benefícios da Riparina sobre o Sistema Nervoso Central



Fonte: Elaborada pela autora

## 9 CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmam que a exposição ao LPS induziu um fenótipo comportamental compatível com depressão, acompanhado de alterações neuroinflamatórias e bioquímicas, enquanto a Riparina III apresentou um expressivo potencial terapêutico nesse contexto. O tratamento com Riparina III reverteu alterações em parâmetros comportamentais, além de modular a via da iNOS, evidenciado pela redução dos níveis de nitrito e pela interação favorável com resíduos essenciais no sítio ativo da enzima. Além disso, também houve melhoria em parâmetros oxidativos.

Nossas descobertas fornecem insights valiosos sobre o impacto da Riparina III em células PC12 e astrócitos, abrindo caminho para investigações adicionais nesses tipos celulares. Esses achados, integrados, colocam a Riparina III como uma candidata promissora no tratamento da depressão associada à neuroinflamação, com potencial também para outras condições neurodegenerativas. Estudos futuros deverão aprofundar a caracterização de seus alvos moleculares e avaliar seu perfil de segurança e eficácia em modelos pré-clínicos ampliados.

Como limitações deste estudo, destaca-se a ausência de imagens visíveis na microscopia eletrônica de varredura, bem como a necessidade de uma análise de citocinas cerebrais mais aprofundada, considerando possíveis variações relacionadas a fatores técnicos (como temperatura de processamento e armazenamento das amostras) e a inclusão de um painel mais amplo de mediadores inflamatórios, o que permitiria melhor compreensão das vias envolvidas.

Novos experimentos visam esclarecer ainda mais os mecanismos subjacentes aos benefícios da Riparina III, proporcionando informações cruciais para seu desenvolvimento como uma terapia potencial para a depressão e outras condições relacionadas à neuroinflamação.

## REFERÊNCIAS

ABD ELMAABOUD, Maaly A. *et al.* Dapagliflozin/Hesperidin Combination Mitigates Lipopolysaccharide-Induced Alzheimer's Disease in Rats. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 10, 1 out. 2023.

AFRIDI, Ruqayya; SUK, Kyoungcho. **Neuroinflammatory Basis of Depression: Learning From Experimental Models.** **Frontiers in Cellular Neuroscience**Frontiers Media S.A., , 2 jul. 2021.

AHL, Louise Isager *et al.* Leaf gel from several Aloe species shows anti-inflammatory properties through the inhibition of lipopolysaccharide (LPS) mediated activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling. **Phytomedicine Plus**, v. 3, n. 1, 1 fev. 2023.

AL-AMIN, Md Mamun *et al.* Pretreatment with Risperidone Ameliorates systemic LPS-induced oxidative stress in the cortex and hippocampus. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. JUN, 8 jun. 2018.

ARAÚJO, Éverton José Ferreira de *et al.* Atividade antioxidante, antitumoral e leishmanicida in vitro da riparina A, um análogo das alcanidas amazônicas de Aniba riparia (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 309–314, 1 jul. 2016.

ARAÚJO, Éverton José Ferreira de *et al.* Pathophysiological investigations, anxiolytic effects and interaction of a semisynthetic riparin with benzodiazepine receptors. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, p. 973–981, 1 jul. 2018.

ARIOZ, B. I. *et al.* Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUL, 2019.

AROSIO, Beatrice *et al.* **Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Major Depression: Do We Have a Translational Perspective?** **Frontiers in Behavioral Neuroscience**Frontiers Media S.A., , 12 fev. 2021.

ARSHAD, Hafiza Maida; AHMAD, Fiaz Ud Din; LODHI, Arslan Hussain. Methanolic Extract of Aerva javanica Leaves Prevents LPS-Induced Depressive Like Behavior in Experimental Mice. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 16, p. 4179–4204, 1 dez. 2022.

ARTEAGA-HENRÍQUEZ, Gara *et al.* Low-grade inflammation as a predictor of antidepressant and anti-inflammatory therapy response in MDD patients: A systematic review of the literature in combination with an analysis of experimental data collected in the EU-Moodinflamm consortium. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. JULY, 2019.

ARYAL, Babita *et al.* Potential Therapeutic Applications of Plant-Derived Alkaloids against Inflammatory and Neurodegenerative Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 7299778, 2022.

BABAEI, Fatemeh *et al.* *Saccharomyces boulardii* attenuates lipopolysaccharide-induced anxiety-like behaviors in rats. **Neuroscience Letters**, v. 778, p. 136600, 2022.

BANERJEE, Shubhasree *et al.* JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. **Drugs**, v. 77, n. 5, p. 521–546, 2017.

BARBOSA, Cristina Rodrigues dos Santos *et al.* **Bioactivities of isolated and synthetic riparins of *Aniba riparia* (NEES) MEZ (LAURACEAE): A brief review.** **Phytochemistry Letters** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2022.

BARBOSA-FILHO, José M.; SILVA, Edvan C. da; BHATTACHARYYA, Jnanabrata. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 332–334, 1990.

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

BARNES, Jacob; MONDELLI, Valeria; PARIANTE, Carmine M. Genetic Contributions of Inflammation to Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 81–98, 2017.

BEHESHTI, Farimah *et al.* Inducible nitric oxide synthase plays a role in depression- and anxiety-like behaviors chronically induced by lipopolysaccharide in rats: Evidence from inflammation and oxidative stress. **Behavioural Brain Research**, v. 392, p. 112720, 2020.

BEUREL, Eléonore; TOUPS, Marisa; NEMEROFF, Charles B. **The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble.** NeuronCell Press, , 22 jul. 2020a.

BEUREL, Eléonore; TOUPS, Marisa; NEMEROFF, Charles B. **The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble.** NeuronCell Press, , 22 jul. 2020b.

BHATT, Shvetank; NAGAPPA, Anantha Naik; PATIL, Chandragouda R. Role of oxidative stress in depression. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 7, p. 1270–1276, 2020.

BINEY, Robert Peter *et al.* Effects of in utero exposure to monosodium glutamate on locomotion, anxiety, depression, memory and KCC2 expression in offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 82, n. 1, p. 50–62, 1 fev. 2022.

BOBERMIN, Larissa Daniele *et al.* Lipopolysaccharide Induces Gliotoxicity in Hippocampal Astrocytes from Aged Rats: Insights About the Glioprotective Roles of Resveratrol. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 1419–1439, 2022.

BOUÇAS, Ana P.; RHEINHEIMER, Jakeline; LAGOPOULOS, Jim. Why Severe COVID-19 Patients Are at Greater Risk of Developing Depression: A Molecular Perspective. **Neuroscientist**, v. 28, n. 1, p. 11–19, 1 fev. 2022.

BOYLE, Chloe C. *et al.* Stress to inflammation and anhedonia: Mechanistic insights from preclinical and clinical models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 152, p. 105307, 2023.

BRUNDIN, L. *et al.* An enzyme in the kynurenine pathway that governs vulnerability to suicidal behavior by regulating excitotoxicity and neuroinflammation. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 8, 2 ago. 2016.

BUS, B. A. A. *et al.* Chronic depression is associated with a pronounced decrease in serum brain-derived neurotrophic factor over time. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 5, p. 602–608, 2015.

BUSSMANN, Hendrik *et al.* St. John's Wort Extract Ze 117 and Escitalopram Alter Plasma and Hippocampal Lipidome in a Rat Model of Chronic-Stress-Induced

Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, 1 dez. 2024.

BUTTERFIELD, D. Allan; HALLIWELL, Barry. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 148–160, 1 mar. 2019.

CAMARGO, Cintia Ramos *et al.* Spectral and computational features of the binding between riparins and human serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 81–88, 5 fev. 2018.

CARVALHO, Alyne Mara Rodrigues *et al.* Antinociceptive activity of Riparin II from *Aniba riparia*: Further elucidation of the possible mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 287, n. April, p. 49–56, 2018.

CASARIL, Angela M. *et al.* Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-challenged mice. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1263–1273, 29 jun. 2017.

CATÃO, Raissa Mayer Ramalho *et al.* Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes \*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 247–249, 2005.

CHAVES, Raquell de Castro *et al.* Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 180, p. 44–51, 1 maio 2019.

CHIHANGA, Tafadzwa *et al.* NMR spectroscopy and electron microscopy identification of metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 314, p. 154–166, 2018.

COLUCCI-D'AMATO, Luca; SPERANZA, Luisa; VOLPICELLI, Floriana. **Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 2 out. 2020.

CORDEIRO, Rafaela Carneiro *et al.* Leptin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors in mice: Involvement of dopamine receptors. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. MAR, 2019.

COSTA, Luciana Muratori *et al.* In vitro antileishmanial and immunomodulatory activities of the synthetic analogue riparin E. **Chemico-Biological Interactions**, v. 336, 25 fev. 2021.

CUI, Lulu *et al.* Major depressive disorder: hypothesis, mechanism, prevention and treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–32, 1 dez. 2024.

DA SILVA, Daniel Moreira Alves *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors alleviated depressive and anxious-like behaviors in mice exposed to lipopolysaccharide: Involvement of oxidative stress and neuroinflammation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 240, p. 173778, 1 jul. 2024.

DANTZER, Robert *et al.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008.

DE LEON, Jesús Aguilar Diaz; BORGES, Chad R. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 159, 1 maio 2020.

DE OLIVEIRA, Victor Moreira *et al.* Molecular docking identification for the efficacy of natural limonoids against COVID-19 virus main protease. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 98, n. 10, p. 100157, 2021.

DE SOUSA, Francisca Cléa Florenço *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 95–103, fev. 2012.

DEL GIUDICE, Marco; GANGESTAD, Steven W. Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 70, p. 61–75, 1 maio 2018.

DENIZOT, François; LANG, Rita. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity

and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 22 maio 1986.

DI LORENZO, Flaviana *et al.* **A Journey from Structure to Function of Bacterial Lipopolysaccharides. Chemical Reviews**American Chemical Society, , 26 out. 2022.

DIXSAUT, Lucie; GRÄFF, Johannes. The medial prefrontal cortex and fear memory: Dynamics, connectivity, and engrams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, 1 nov. 2021.

DOS SANTOS, Balbino Lino *et al.* The Flavonoid Agathisflavone Directs Brain Microglia/Macrophages to a Neuroprotective Anti-Inflammatory and Antioxidant State via Regulation of NLRP3 Inflammasome. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, 1 maio 2023a.

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

DRAGON, Jonasz *et al.* Escitalopram reverses anxiety-like and despair behavior and affects endocannabinoid-related genes expression in the brain of adolescent male rats subjected to early life stress. **Neuroscience**, v. 567, p. 96–108, 16 fev. 2025.

ERUSTES, Adolfo Garcia *et al.* Overexpression of  $\alpha$ -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. **Journal of neuroscience research**, v. 96, n. 1, p. 160–171, 1 jan. 2018.

ETTMAN, Catherine K.; GOICOECHEA, Elena Badillo; STUART, Elizabeth A. Evolution of depression and anxiety over the COVID-19 pandemic and across demographic groups in a large sample of U.S. adults. **AJPM Focus**, p. 100140, 2023.

EVANS-LACKO, S. *et al.* Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: Results from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. **Psychological Medicine**, v. 48, n. 9, p. 1560–1571, 1 jul. 2018.

FEEHAN, Karen T.; GILROY, Derek W. **Is Resolution the End of Inflammation? Trends in Molecular Medicine**Elsevier Ltd, , 1 mar. 2019.



FELGER, Jennifer C.; MILLER, Andrew H. Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: The subcortical source of inflammatory malaise. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 33, n. 3, p. 315–327, 1 ago. 2012.

FILATOVA, Elena V.; SHADRINA, Maria I.; SLOMINSKY, Petr A. **Major depression: One brain, one disease, one set of intertwined processes**. **CellsMDPI**, , 2021.

FILE, Sandra E.; WARDILL, Ann G. **Validity of Head-Dipping as a Measure of Exploration in a Modified Hole-Board** **Psychopharmacologia (Berl.)**. [S.l.]: Springer-Verlag, 1975.

FREIMER, Daniel *et al.* The gut microbiota, HPA axis, and brain in adolescent-onset depression: Probiotics as a novel treatment. **Brain, Behavior, and Immunity - Health**, v. 26, 1 dez. 2022.

GAO, Yuting *et al.* Dihydroartemisinin ameliorates LPS-induced neuroinflammation by inhibiting the PI3K/AKT pathway. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, n. 4, p. 661–672, 2020.

GARCIA, Daniela C. G. *et al.* Structure-related blockage of calcium channels by vasodilator alkamides in mice mesenteric artery. **Vascular Pharmacology**, v. 82, p. 60–65, 1 jul. 2016.

GONÇALVES, Carlos-Alberto *et al.* Glycolysis-Derived Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, 2019.

GONG, Tao *et al.* **DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases**. **Nature Reviews Immunology** *Nature Research*, , 1 fev. 2020.

GORMAN, Adrienne M. *et al.* **Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells**. **Cytometry**, 1 out. 1997.

GREEN, Laura C.; TANNENBAUM, Steven R.; GOLDMAN, Peter. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, 1981.

GUNUC, Selim; KOYLU, Ersin O. Investigation of the Relationships Between Beck Depression/Anxiety Scores and Neuropsychological Tests Scores with Lifestyle Behaviors in the Context of Neuroplasticity and Neurogenesis Approach. **Neuroscience**, v. 516, p. 62–74, 15 abr. 2023a.

GUNUC, Selim; KOYLU, Ersin O. Investigation of the Relationships Between Beck Depression/Anxiety Scores and Neuropsychological Tests Scores with Lifestyle Behaviors in the Context of Neuroplasticity and Neurogenesis Approach.

**Neuroscience**, v. 516, p. 62–74, 15 abr. 2023b.

HAKIMI, Zhara *et al.* Protective Effects of Carvacrol on Brain Tissue Inflammation and Oxidative Stress as well as Learning and Memory in Lipopolysaccharide-Challenged Rats. **Neurotoxicity Research**, v. 37, n. 4, p. 965–976, 2020.

HAN, Xuebing *et al.* **Roles of Macrophages in the Development and Treatment of Gut Inflammation. Frontiers in Cell and Developmental Biology**Frontiers Media S.A., , 2 mar. 2021.

HANNESTAD, Jonas; DELLAGIOIA, Nicole; BLOCH, Michael. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: A meta-analysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 12, p. 2452–2459, nov. 2011.

HANWELL, Marcus D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

HE, Fan *et al.* Association of domain-specific physical activity with depressive symptoms: A population-based study. **European Psychiatry**, v. 66, n. 1, 2023.

HOFER, Otmar *et al.* <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkalamides with cyclic amide moieties -amides from achilleafalcata. **Tetrahedron**, v. 42, n. 10, p. 2707–2716, 1 jan. 1986.

HOHLS, Johanna Katharina *et al.* **Anxiety, depression and quality of life—a systematic review of evidence from longitudinal observational studies. International Journal of Environmental Research and Public Health**MDPI, , 1 nov. 2021.

HUSSAIN, Ghulam *et al.* Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 3, p. 341–357, 2018.

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

INSERRA, Antonio *et al.* **Neuroimmunomodulation in Major Depressive Disorder: Focus on Caspase 1, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Interferon-Gamma. Molecular Neurobiology** Humana Press Inc., , 1 jun. 2019.

JABBI, Mbemba *et al.* Neuro-transcriptomic signatures for mood disorder morbidity and suicide mortality. **Journal of Psychiatric Research**, v. 127, p. 62–74, 1 jul. 2020.

JAZVINŠČAK JEMBREK, Maja *et al.* **Flavonols in Action: Targeting Oxidative Stress and Neuroinflammation in Major Depressive Disorder. International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 abr. 2023.

JIANG, Yumao *et al.* Neuroprotective effect of water extract of Panax ginseng on corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells and its underlying molecule mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 102–112, 2015.

JING, Wen *et al.* *Mahuang-Fuzi-Xixin* Decoction Reverses Depression-Like Behavior in LPS-Induced Mice by Regulating NLRP3 Inflammasome and Neurogenesis. **Neural Plasticity**, v. 2019, p. 1571392, 2019.

JOHNSTON, Jenessa N. *et al.* **Inflammation, stress and depression: An exploration of ketamine's therapeutic profile. Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2023.

KELLY, Chris A.; FREEMAN, Kevin B.; SCHUMACHER, Julie A. **Treatment-resistant depression with anhedonia: Integrating clinical and preclinical approaches to investigate distinct phenotypes. Neuroscience and Biobehavioral Reviews** Elsevier Ltd, , 1 maio 2022.

KHALLAF, Iman S. A. *et al.* The inhibition of inducible nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated rat macrophages and in silico studies by flavonoids from *Iris spuria* L. rhizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114311, 2021.

KHAN, Ajmal *et al.* **Editorial: Natural products as an emerging therapeutic alternative for the treatment of anxiety and depression, Volume II.** *Frontiers in Pharmacology*Frontiers Media S.A., , 14 dez. 2022.

KO, Hyun Myung *et al.* Tyrosine kinase Fyn regulates iNOS expression in LPS-stimulated astrocytes via modulation of ERK phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 495, n. 1, p. 1214–1220, 2018.

KONG, Anqi *et al.* Novel antidepressant-like properties of the fullereneol in an LPS-induced depressive mouse model. *International Immunopharmacology*, v. 116, p. 109792, 2023.

KONG, Xiangyu *et al.* Prevalence and Factors Associated with Depression and Anxiety of Hospitalized Patients with COVID-19. *medRxiv*, mar. 2020.

KÖNIG, Hannah *et al.* The Excess Costs of Depression and the Influence of Sociodemographic and Socioeconomic Factors: Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS). *PharmacoEconomics*, v. 39, n. 6, p. 667–680, 1 jun. 2021.

KOOSHKI, Leila *et al.* The pivotal role of JAK/STAT and IRS/PI3K signaling pathways in neurodegenerative diseases: Mechanistic approaches to polyphenols and alkaloids. *Phytomedicine*, v. 112, p. 154686, 2023.

KSHIRSAGAR, Viplav *et al.* Hydrogen Sulfide Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Mice by Reducing Apoptosis, Oxidative, and Inflammatory Effects. *Neurotoxicity Research*, v. 39, n. 4, p. 1310–1322, 2021.

KUMAR, Robin; SANEJA, Ankit; PANDA, Amulya K. An Annexin V-FITC—Propidium Iodide-Based Method for Detecting Apoptosis in a Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line. *Methods in Molecular Biology*, v. 2279, p. 213–223, 2021.

LEE, Hyun-Seung *et al.* Anti-inflammatory effects of *Allium cepa* L. peel extracts via inhibition of JAK-STAT pathway in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 116851, dez. 2023.

LEONARD, Brian E. **Inflammation and depression: A causal or coincidental link to the pathophysiology?** *Acta Neuropsychiatrica*Cambridge University Press, , 1 fev. 2018.

LI, Weifen *et al.* Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 92, p. 10–24, 1 fev. 2021.

LI, Xueyan *et al.* Hydrogen sulfide inhibits lipopolysaccharide-based neuroinflammation-induced astrocyte polarization after cerebral ischemia/reperfusion injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 949, 15 jun. 2023.

LI, Yiyi *et al.* **The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system.** **Frontiers in Aging Neuroscience**Frontiers Media S.A., , 8 set. 2022a.

LI, Yuan *et al.* Assessment of mitochondrial dysfunction and implications in cardiovascular disorders. **Life Sciences**, v. 306, p. 120834, 2022b.

LOPES, Iardja Stéfane *et al.* Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 33–42, 1 nov. 2018.

LORKIEWICZ, Piotr; WASZKIEWICZ, Napoleon. **Biomarkers of post-COVID depression.** **Journal of Clinical Medicine**MDPI, , 1 set. 2021.

LU, Qingyi *et al.* Tetrandrine Ameliorates Rheumatoid Arthritis in Mice by Alleviating Neutrophil Activities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.

LYRA E SILVA, Natalia M. *et al.* Inflammation at the crossroads of COVID-19, cognitive deficits and depression. **Neuropharmacology**, v. 209, 15 maio 2022.

M. BARBOSA-FILHO, José *et al.* Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615–2617, 1 jan. 1987.

MALHI, Gin S.; MANN, J. John. **Depression.** **The Lancet**Lancet Publishing Group, , 24 nov. 2018.

MALLMANN, Auriana Serra Vasconcelos *et al.* Is Riparin III a promising drug in the treatment for depression? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 162, n. May 2020, 2021a.

MALLMANN, Auriana Serra Vasconcelos *et al.* Is Riparin III a promising drug in the treatment for depression? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 162, 1 jul. 2021b.

MARWAHA, Steven *et al.* Novel and emerging treatments for major depression. **The Lancet**, v. 401, n. 10371, p. 141–153, 14 jan. 2023.

MATSUMOTO, Daiki *et al.* Bumetanide prevents diazepam-modified anxiety-like behavior in lipopolysaccharide-treated mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 904, p. 174195, 2021.

MAZZA, Mario Gennaro *et al.* Anxiety and depression in COVID-19 survivors: Role of inflammatory and clinical predictors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 89, p. 594–600, 1 out. 2020.

MELLO, Bruna Stefânia Ferreira *et al.* Doxycycline at subantimicrobial dose combined with escitalopram reverses depressive-like behavior and neuroinflammatory hippocampal alterations in the lipopolysaccharide model of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 292, p. 733–745, 1 set. 2021a.

MELLO, Bruna Stefânia Ferreira *et al.* Doxycycline at subantimicrobial dose combined with escitalopram reverses depressive-like behavior and neuroinflammatory hippocampal alterations in the lipopolysaccharide model of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 292, p. 733–745, 1 set. 2021b.

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

MELO, Carla Thiciane Vasconcelos de *et al.* Anxiolytic-Like Effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451–454, 2006.

MOREIRA, Lorrane Kelle da Silva *et al.* LQFM212, a piperazine derivative, exhibits potential antioxidant effect as well as ameliorates LPS-induced behavioral, inflammatory and oxidative changes. **Life Sciences**, v. 312, p. 121199, 2023.

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

MOSMANN, Tim. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays** **Journal of Immunological Methods**. [S.l.: S.n.].

MUHAMMAD, Tahir *et al.* Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2019.

NASCIMENTO, Olívia Azevêdo *et al.* Pharmacological properties of riparin IV in models of pain and inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 12, 1 dez. 2016.

NASSAR, Ahmad; AZAB, Abed N. Effects of Dexamethasone and Pentoxifylline on Mania-like and Depression-like Behaviors in Rats. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, 1 set. 2022.

NUNES, Geandra Batista Lima *et al.* Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. **Life Sciences**, v. 121, p. 57–64, 15 jan. 2015.

OLIVEIRA, Iris Cristina Maia *et al.* Neuroprotective and Antioxidant Effects of Riparin I in a Model of Depression Induced by Corticosterone in Female Mice. **Neuropsychobiology**, v. 81, n. 1, p. 28–38, 1 fev. 2022.

OLIVEIRA-JÚNIOR, Jorge Belém *et al.* Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, 1 dez. 2020.

OMS. <https://www.who.int/teams/mental-health-and-substance-use/promotion-prevention/maternal-mental-health#:~:text=Worldwide%20about%2010%25%20of%20pregnant,and%2019.8%25%20after%20child%20birth>.

PALLACH, Mateusz *et al.* Structure and inflammatory activity of the LPS isolated from *Acetobacter pasteurianus* CIP103108. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1027–1035, 2018.

PANTAZATOS, S. P. *et al.* Whole-transcriptome brain expression and exon-usage profiling in major depression and suicide: evidence for altered glial, endothelial and ATPase activity. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 760–773, 2017.

PAPASTERGIADIS, Antonios *et al.* Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Test in various foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 38, p. 9589–9594, 26 set. 2012.

PATEL, Dhilon S. *et al.* Escherichia coli O176 LPS structure and dynamics: A NMR spectroscopy and MD simulation study. **Current Research in Structural Biology**, v. 2, p. 79–88, 2020.

PATEL, Sita Sharan *et al.* Depression mediates impaired glucose tolerance and cognitive dysfunction: A neuromodulatory role of rosiglitazone. **Hormones and Behavior**, v. 78, p. 200–210, 2016.

PELLOW, Sharon *et al.* Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1 ago. 1985.

PENG, Xiaoyao *et al.* **Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**Frontiers Media S.A., , 4 nov. 2021.

PERKOVIC, Stephen J. M.; PECHENKOV, Ingrid G. Personality predictors of anhedonia and depression: The role of the big five, autonomy, and sociotropy. **Personality and Individual Differences**, v. 208, p. 112158, 2023.

PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

POLADIAN, Nicole *et al.* Potential Role of Glutathione Antioxidant Pathways in the Pathophysiology and Adjunct Treatment of Psychiatric Disorders. **Clinics and Practice**, v. 13, n. 4, p. 768, 1 ago. 2023.

PORSOLT, Roger D.; BERTIN, Anne; JALFRE, Maurice. “Behavioural despair” in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 291–294, 1 out. 1978.



QIAO, Liang; WONG, Benjamin C. Y. Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 12, n. 3, p. 55–64, jun. 2009.

RAO, Uma; CHEN, Li-Ann. Characteristics, correlates, and outcomes of childhood and adolescent depressive disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 45–62, 31 mar. 2009.

RAYMOND, Catherine *et al.* **Early child adversity and psychopathology in adulthood: HPA axis and cognitive dysregulations as potential mechanisms. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** Elsevier Inc., , 13 jul. 2018.

RENAULT, Pierre F. *et al.* Psychiatric Complications of Long-term Interferon Alfa Therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 147, n. 9, p. 1577–1580, 1 set. 1987.

RICKELS, Karl *et al.* Adjunctive therapy with pregabalin in generalized anxiety disorder patients with partial response to SSRI or SNRI treatment. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 142–150, maio 2012.

RITCHIE, Karen; CHAN, Dennis. **The emergence of cognitive COVID. World Psychiatry** Blackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2021.

ROSENFELD, Robin J. *et al.* Conformational changes in nitric oxide synthases induced by chlorzoxazone and nitroindazoles: Crystallographic and computational analyses of inhibitor potency. **Biochemistry**, v. 41, n. 47, p. 13915–13925, 26 nov. 2002.

RUTHERFORD, Ashleigh V; MCDOUGLE, Samuel D.; JOORMANN, Jutta. “Don’t [ruminate], be happy”: A cognitive perspective linking depression and anhedonia. **Clinical Psychology Review**, v. 101, p. 102255, 2023.

SABEDRA SOUSA, Fernanda Severo *et al.* Lipopolysaccharide-induced depressive-like, anxiogenic-like and hyperalgesic behavior is attenuated by acute administration of  $\alpha$ -(phenylselanyl) acetophenone in mice. **Neuropharmacology**, v. 146, p. 128–137, 2019.

SADRAIE, Sepideh *et al.* Berberine ameliorates lipopolysaccharide-induced learning and memory deficit in the rat: insights into underlying molecular mechanisms.

**Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 1, p. 245–255, 2019.

SALEM, Mohamed A. *et al.* Metabolomics driven analysis of *Nigella sativa* seeds identifies the impact of roasting on the chemical composition and immunomodulatory activity. **Food Chemistry**, v. 398, p. 133906, 2023.

SANGARAN, Pushpa Gandhi *et al.* Lipopolysaccharide Pre-conditioning Attenuates Pro-inflammatory Responses and Promotes Cytoprotective Effect in Differentiated PC12 Cell Lines via Pre-activation of Toll-Like Receptor-4 Signaling Pathway Leading to the Inhibition of Caspase-3/Nuclear Factor-kappa B Pathway. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 22 jan. 2021.

SANTOS, Sócrates Golzio *et al.* Psychopharmacological effects of riparin iii from *aniba riparia* (Nees) mez. (lauraceae) supported by metabolic approach and multivariate data analysis. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, 16 maio 2020.

SARTER, Martin; BODEWITZ, Geert; STEPHENS, David N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist  $\beta$ -carboline. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 4, p. 491–495, 1988.

SARTORI, Danusio Pinheiro *et al.* Involvement of monoaminergic targets in the antidepressant- and anxiolytic-like effects of the synthetic alkamide riparin IV: Elucidation of further mechanisms through pharmacological, neurochemistry and computational approaches. **Behavioural Brain Research**, v. 383, 6 abr. 2020.

SCHUTTER, Jan David *et al.* Synthesis and characterization of lipopolysaccharide (LPS) anchored polystyrene microparticles as a synthetic model system for attachment studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 226, 1 jun. 2023.

SERAFINI, Gianluca *et al.* **The Role of Inflammation in the Pathophysiology of Depression and Suicidal Behavior: Implications for Treatment.** **Medical Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 jan. 2023.

SHARMA, Neha; NEHRU, Bimla. Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. **Neurochemistry International**, v. 87, p. 92–105, 2015.

SILVA, Emanuel Pereira *et al.* Antifungal and Antibiofilm Activity of Riparin III against Dermatophytes. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023.

SKRZYPCZAK-WIERCIOCH, Anna; SAŁAT, Kinga. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5481, 1 set. 2022.

SONG, Yu *et al.* Mitochondrial dysfunction: A fatal blow in depression. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115652, 2023.

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

SPOHR, Luiza *et al.* Blueberry extract as a potential pharmacological tool for preventing depressive-like behavior and neurochemical dysfunctions in mice exposed to lipopolysaccharide. **Nutritional Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 857–870, 3 abr. 2022.

STÄHLE, Jonas; WIDMALM, Göran. Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria: Biosynthesis and Structural Aspects. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 31, n. 184, p. E159–E171, 2019.

STEARDO, Luca; STEARDO, Luca; VERKHRATSKY, Alexei. **Psychiatric face of COVID-19. Translational Psychiatry** Springer Nature, , 1 dez. 2020.

STUEHR, Dennis J. *et al.* **Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. Journal of Biological Chemistry**, 27 ago. 2004.

SULAKHIYA, Kunjbihari *et al.* Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. **Neuroscience Letters**, v. 611, p. 106–111, 2016.

SUN, Jie *et al.* CRHR1 antagonist alleviates LPS-induced depression-like behaviour in mice. **BMC Psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 17, 2023.

SUN, Xialin *et al.* The protective effect of 5-O-methylvisammioside on LPS-induced depression in mice by inhibiting the over activation of BV-2 microglia through Nf- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$  pathway. **Phytomedicine**, v. 79, p. 153348, 2020.

SUNDARAPPERUMA, Thamudi Darshi *et al.* Psychological disturbances encountered by the healthcare professionals, military professionals and general public in Sri Lanka during COVID-19 pandemic: a cross-sectional study. **BMC psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 452, 1 dez. 2023.

TANG, Ying *et al.* Involvement of HECTD1 in LPS-induced astrocyte activation via  $\sigma$ -1R-JNK/p38-FOXJ2 axis. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 62, 2021.

TARTT, Alexandria N. *et al.* **Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression: pathogenesis and therapeutic implications.** **Molecular Psychiatry** Springer Nature, , 1 jun. 2022.

TASNEEM, Shumaila *et al.* **Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents.** **Pharmacological Research** Academic Press, , 1 jan. 2019.

TAYAB, Mohammed Abu *et al.* Targeting neuroinflammation by polyphenols: A promising therapeutic approach against inflammation-associated depression. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 147, p. 112668, 2022.

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

TEJERO, Jesús *et al.* Mechanism and regulation of ferrous heme-nitric oxide (NO) oxidation in NO synthases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 19, p. 7904–7916, 2019.

THICIANE, Carla *et al.* **Anxiolytic-Like Effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from Aniba riparia (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice** **Pharm. Bull. [S.l.: S.n.]**.

THINGORE, Chetan; KSHIRSAGAR, Viplav; JUVEKAR, Archana. Amelioration of oxidative stress and neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced memory impairment using Rosmarinic acid in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 2, p. 299–313, 2021a.

THINGORE, Chetan; KSHIRSAGAR, Viplav; JUVEKAR, Archana. Amelioration of oxidative stress and neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced memory

impairment using Rosmarinic acid in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 2, p. 299–313, 1 fev. 2021b.

TIAN, Jun-sheng *et al.* Metabolomics studies on corticosterone-induced PC12 cells: A strategy for evaluating an in vitro depression model and revealing the metabolic regulation mechanism. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 69, p. 27–38, 2018.

TOMAZ, Viviane de Sousa *et al.* Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro- and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 268, p. 188–200, 1 maio 2020.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

VALE, Larice de Carvalho *et al.* Gastroprotection of Riparin III in the Acute Model of Ethanol-Induced Gastric Lesion in Mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 9 ago. 2023.

VARKI, Ajit. Biological roles of glycans. **Glycobiology**, v. 27, n. 1, p. 3–49, 1 jan. 2017.

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

VASCONCELOS, Auriana Serra. **Efeito antidepressivo da Riparina III em camundongos submetidos ao modelo de estresse induzido pela administração de corticosterona. [S.l.: S.n.]**

VASOVIĆ, Dolika D. *et al.* Shortened Daily Photoperiod Alleviates Anxiety-like Behaviour by Antioxidant Effect and Changes Serum Fatty Acid Profile in Diabetic Rats. **Journal of Personalized Medicine**, v. 13, n. 5, 2023.

WANG, H. *et al.* The role of Akt/FoxO3a in the protective effect of venlafaxine against corticosterone-induced cell death in PC12 cells. **Psychopharmacology**, v. 228, n. 1, p. 129–141, 2013.

WANG, Yu *et al.* Altered BDNF levels are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease patients with depression. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 103, p. 122–128, 1 out. 2022.

WHO. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. [S.l.]: World Health Organization, 2017.

WOODY, C. A. *et al.* A systematic review and meta-regression of the prevalence and incidence of perinatal depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 219, p. 86–92, 1 set. 2017.

WORSLEY, Catherine M.; VEALE, Rob B.; MAYNE, Elizabeth S. Inducing apoptosis using chemical treatment and acidic pH, and detecting it using the Annexin V flow cytometric assay. **PLoS ONE**, v. 17, n. 6 June, 1 jun. 2022.

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

WU, Yun *et al.* The Economic Burden Associated with Depressive Symptoms among Middle-Aged and Elderly People with Chronic Diseases in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, 1 out. 2022.

WU, Zuotian *et al.* **Neurogenic hypothesis of positive psychology in stress-induced depression: Adult hippocampal neurogenesis, neuroinflammation, and stress resilience**. **International Immunopharmacology** Elsevier B.V., , 1 ago. 2021.

XU, Manman *et al.* Kaixin Jieyu Granule attenuates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through TLR4/PI3K/AKT/FOXO1 pathway: a study of network pharmacology and experimental validation. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 156, 2023.

YADAV, Pooja; CHOWDHURY, Papia. Effectivity of repurposed drugs against SARS-CoV-2 infections, A hope for COVID 19: inhibitor modelling studies by docking and molecular dynamics. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12327, 2022.

YAMAMOTO, Naoki *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) suppresses follicle development marker expression and enhances cytokine expressions, which results in fail to granulosa cell proliferation in developing follicle in cows. **Reproductive Biology**, v. 23, n. 1, 1 mar. 2023.

YATOO, Mohd. I. *et al.* Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders - A Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 12, n. 1, p. 39–58, 16 jan. 2018.

YE, Jieming *et al.* Protective effect of SIRT1 on toxicity of microglial-derived factors induced by LPS to PC12 cells via the p53-caspase-3-dependent apoptotic pathway. **Neuroscience Letters**, v. 553, p. 72–77, 2013.

YEOM, Mijung *et al.* Acupuncture attenuates comorbid anxiety- and depressive-like behaviors of atopic dermatitis through modulating neuroadaptation in the brain reward circuit in mice. **Biological Research**, v. 55, n. 1, 1 dez. 2022.

YIRMIYA, Raz. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research**, v. 711, n. 1–2, p. 163–174, 4 mar. 1996.

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

ZENG, Wen *et al.* Natural antioxidant formula ameliorates lipopolysaccharide-induced impairment of hippocampal neurogenesis and contextual fear memory through suppression of neuroinflammation in rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 131, 1 set. 2023.

ZHANG, Hao *et al.* A Combination of 3D-QSAR, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Studies of Benzimidazole-Quinolinone Derivatives as iNOS Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 11210–11227, 2012.

ZHANG, Xue Ying *et al.* A systematic review and meta-analysis of thigmotactic behaviour in the open field test in rodent models associated with persistent pain. **PLOS ONE**, v. 18, n. 9, p. e0290382, 8 set. 2023.

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

ZHAO, Lin *et al.* Steroidal alkaloid solanine A from *Solanum nigrum* Linn. exhibits anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide/interferon  $\gamma$ -activated murine macrophages and animal models of inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 606–615, 2018.

ZHENG, Menglin *et al.* Geniposide protects depression through BTK/JAK2/STAT1 signaling pathway in lipopolysaccharide-induced depressive mice. **Brain Research Bulletin**, v. 170, p. 65–73, 2021.

ZUNSZAIN, Patricia A.; HEPGUL, Nilay; PARIANTE, Carmine M. Inflammation and Depression. *In*: COWEN, Philip J.; SHARP, Trevor; LAU, Jennifer Y. F. (Orgs.). **Behavioral Neurobiology of Depression and Its Treatment**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 135–151.



## ANEXO A



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DOS EFEITOS in vitro E in vivo DA RIPARINA III EM UM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE *Escherichia Coli*", protocolada sob o CEUA nº 7259230822 (ID 002334), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa e equipe; Larice de Carvalho Vale; Manoela de Oliveira Rebouças; Daniel Moreira Alves da Silva; Kalleu Fernando de Alencar Carvalho; Sheila Mara Aires Bandeira; Verônica Alice Medeiros Moraes; Paolla Emanuella Carvalho de Oliveira; Bruna Ortiz Silva de Oliveira; Priscila Silva Coelho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 08/11/2022.

We certify that the proposal "STUDY OF THE IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF RIPARIN III IN A LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)-INDUCED NEUROINFLAMMATION MODEL OF *Escherichia Coli*", utilizing 250 Isogenics mice (250 males), protocol number CEUA 7259230822 (ID 002334), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa and team; Larice de Carvalho Vale; Manoela de Oliveira Rebouças; Daniel Moreira Alves da Silva; Kalleu Fernando de Alencar Carvalho; Sheila Mara Aires Bandeira; Verônica Alice Medeiros Moraes; Paolla Emanuella Carvalho de Oliveira; Bruna Ortiz Silva de Oliveira; Priscila Silva Coelho** - 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 11/08/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 11/2022 a 03/2025 Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 42 a 48 dias

Quantidade: 250

Linhagem: C57BL/6

Peso: 22 a 29 g

Fortaleza, 14 de setembro de 2023

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

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

