



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

**IARDJA STÉFANE LOPES**

**EFEITO DA RIPARINA II NA REVERSÃO DE ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS  
AO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR CORTICOSTERONA**

**FORTALEZA**

**2017**

**IARDJA STÉFANE LOPES**

**EFEITO DA RIPARINA II NA REVERSÃO DE ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS  
AO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR CORTICOSTERONA**

**FORTALEZA**

**2017**

IARDJA STÉFANE LOPES

EFEITO DA RIPARINA II NA REVERSÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE  
DEPRESSÃO INDUZIDA POR CORTICOSTERONA

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

Orientador: Profa. Dra. Francisca Cléa  
Florenço de Sousa

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L852e Lopes, Iardja Stéfane.  
Efeito da riparina II na reversão de alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona / Iardja Stéfane Lopes. – 2017.  
82 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa .
1. Riparina II. 2. Antidepressivo. 3. Corticosterona. 4. Estresse Oxidativo. 5. Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo. I. Título.

CDD 615.1

---

IARDJA STÉFANE LOPES

EFEITO DA RIPARINA II NA REVERSÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE  
DEPRESSÃO INDUZIDA POR CORTICOSTERONA

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

Orientador: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

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

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Rita Neuma Dantas Cavalcante de Abreu  
Universidade de Fortaleza (Unifor)

**A Deus,**

a fonte de todo o conhecimento.

**Aos meus pais,**

que fizeram de tudo para que o conhecimento  
chegasse a mim.

## AGRADECIMENTOS

Ao Eterno, o Criador de todas as coisas, por sua graça e bondade infinitas, que me permitem viver e, mesmo sem merecimento algum de minha parte, experimentar momentos agradáveis junto de pessoas queridas. Que qualquer próximo passo que eu der seja guiado por Sua vontade perfeita.

Aos meus pais, a base de tudo. Por meio de quem sou encorajada a me empenhar em cada atividade desenvolvida. Sem esse apoio, eu não teria sequer chegado à graduação. Hoje, concluo mais uma etapa, como tentativa de retribuir o orgulho que me dão. E ainda é pouco.

Aos meus amigos mais chegados, Filipe, Larissa, Wallace e Thaís, por estarem presentes em todos os momentos importantes e me permitirem ver o cuidado de Deus por mim.

A meu noivo, Johnny, por sua companhia inestimável! Parafraseando Lutero, posso dizer que meu querido Johnny me mantém jovem, e em boa forma também... Sem ele, eu ficaria totalmente perdida. Ele cuida de mim nas minhas tristezas e suporta meus acessos de ansiedade, além de compartilhar as minhas alegrias. Ele me ajuda em meu trabalho, e acima de tudo, ama a Cristo. Depois Dele, Johnny é o maior presente que Deus já me deu nesta vida.

A todos do Laboratório de Neurofarmacologia. Aos mais chegados, que me acompanham desde a graduação e que, mais que companheiros de experimentos, são meus amigos: Alana e Klistenes. Aos colegas pós-graduandos por todo o conhecimento compartilhado e companhia nos experimentos: Íris, Auriana, Raquell, Natália, Mari Fernandes e Victor. Às técnicas do lab, que auxiliam a todos e sempre com um sorriso no rosto: Vila, Lena e Luciana. Aos ICs, que embora achem que estão sendo ensinados por nós, estão, na verdade, nos ensinando e ajudando muito mais: Daniel, Mariana e, principalmente, Tiago, que me ajudou do começo ao fim desse trabalho, sempre solícito e engajado.

À minha orientadora querida, Profa Cléa, que com sua amabilidade e paciência, em muito se assemelha às nossas mães. Talvez por isso, seja fácil conversar com ela sobre tudo, sem medo de sair de sua sala sem uma boa dose de encorajamento.

Às professoras Marta Fonteles e Rita Neuma, por aceitarem o convite para participar da banca e estarem dispostas a contribuir com meu trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“Ainda que eu tenha todo o conhecimento, se não tiver amor nada serei. O amor nunca perece, mas o conhecimento passará.”*

*Cf. 1 Coríntios 13*

## RESUMO

A depressão é um transtorno comum e recorrente, e a principal causa de incapacidade no mundo. Estudos têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo e de fatores neurotróficos na patogênese da depressão, o que tem direcionado a busca por novos agentes terapêuticos, que apresentem atividade antioxidante e neuroprotetora. A riparina II (RIP II) é uma alcaloide isolada de *Aniba riparia* que apresentou atividade antidepressiva e ansiolítica em modelos de estresse agudo. Este estudo teve como objetivo investigar a atividade de RIP II em um modelo animal de depressão induzida por corticosterona (CORT). Camundongos *Swiss* fêmeas, 22-26g, foram utilizados nos experimentos e receberam CORT (20 mg/kg) ou veículo por via subcutânea uma vez ao dia durante 22 dias. A partir do 14º dia, foi administrado, por via oral, veículo ou RIP II (50 mg/kg) ou Fluvoxamina (50 mg/kg, antidepressivo padrão) após a injeção de CORT, durante os últimos 8 dias de tratamento com o hormônio. Os camundongos foram expostos aos seguintes testes comportamentais: nado forçado, suspensão da cauda, campo aberto, preferência por sacarose, labirinto em cruz elevado e labirinto em Y. Após a avaliação comportamental, as áreas cerebrais (cortex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo) foram dissecadas para a avaliação neuroquímica: parâmetros de estresse oxidativo (MDA, nitrito e GSH) e dosagem de BDNF. A análise estatística dos dados foi realizada por *one-way* ANOVA, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. O tratamento com CORT desenvolveu comportamento tipo depressivo, ansioso e déficit cognitivo nos animais. A administração subcrônica de RIP II, de maneira semelhante ao antidepressivo padrão, apresentou atividade antidepressiva, diminuindo o tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão da cauda, sendo desprovida de efeito sobre a atividade locomotora dos animais, como demonstrado no campo aberto. Além disso, RIP II apresentou atividade ansiolítica no labirinto em cruz elevado e reverteu o déficit cognitivo causado por CORT no labirinto em Y. RIP II também foi capaz de reverter o dano oxidativo causado por CORT, diminuindo os níveis de nitrito e MDA nas três áreas cerebrais avaliadas, além de reverter a diminuição de GSH no córtex pré-frontal. Os níveis de BDNF, que foram diminuídos com a administração de CORT, foram aumentados com a administração de RIP II. Esses resultados mostram o efeito antidepressivo e neuroprotetor de RIP II contra os danos causados pelo estresse, sugerindo que, posteriormente, esta poderá ser usada como alternativa farmacoterapêutica no tratamento da depressão.

**Palavras-chave:** Riparina II. Antidepressivo. Corticosterona. Estresse oxidativo. Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo.

## ABSTRACT

Effect of riparin II on the reversion of behavioral and neurochemical alterations in mice submitted to the model of depression induced by corticosterone

Depression is a common and recurrent disorder, and the leading cause of disability in the world. Studies have suggested the involvement of oxidative stress and neurotrophic factors in the pathogenesis of depression, which has directed the search for new therapeutic agents that present antioxidant and neuroprotective activity. Riparin II (RIP II) is an isolated alkaloid of *Aniba riparia* that presented antidepressant and anxiolytic activity in models of acute stress. This study aimed to investigate the activity of RIP II in an animal model of depression induced by corticosterone (CORT). Female Swiss mice, 22-26g, were used in the experiments and received CORT (20 mg/kg) or vehicle subcutaneously once daily for 22 days. From the 14th day onward, RIP II (50 mg/kg) or Fluvoxamine (50 mg/kg, standard antidepressant) was given orally following CORT injection during the last 8 days of treatment with the hormone. The mice were exposed to the following behavioral tests: forced swimming, tail suspension, open field, sucrose preference, elevated plus maze and Ymaze. After behavioral evaluation, brain areas (pre-frontal cortex, striatum and hippocampus) were dissected for neurochemical evaluation: oxidative stress parameters (MDA, nitrite and GSH) and BDNF dosage. Statistical analysis of the data was performed by one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls post-hoc test. The treatment with CORT developed depressive and anxiety-like behavior, and cognitive deficits in the animals. The subchronic administration of RIP II, similarly to the standard antidepressant, showed antidepressant activity decreasing the immobility time in the forced swimming and tail suspension tests, being devoid of effect on the locomotor activity of the animals, as demonstrated in the open field. In addition, RIP II showed anxiolytic activity in the elevated plus maze and reversed the cognitive deficit caused by CORT in the Ymaze. RIP II was also able to reverse the oxidative damage caused by CORT, decreasing levels of nitrite and MDA in the three areas evaluated, in addition to reversing the decrease of GSH in the prefrontal cortex. BDNF levels, which were decreased with CORT administration, were increased with RIP II administration. These results show the antidepressant and neuroprotective effect of RIP II against the stress damages, suggesting that it can later be used as a pharmacotherapeutic alternative in the treatment of depression.

**Keywords:** Riparin II. Antidepressant. Corticosterone. Oxidative stress. Brain-Derived Neurotrophic Factor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal.....	20
Figura 2 – Alteração na expressão de BDNF em decorrência do polimorfismo Val/Met.	25
Figura 3 – Aniba riparia (Nees) Mez.....	28
Figura 4 – Ações biológicas das riparinas.....	29
Figura 5 – Estrutura química da riparina II.....	30
Figura 6 – Representação esquemática do desenho experimental.....	35
Figura 7 – Teste do Campo Aberto.....	36
Figura 8 – Teste do Nado Forçado.....	37
Figura 9 – Teste de Suspensão da Cauda.....	38
Figura 10 – Teste de Preferência pela solução de sacarose.....	39
Figura 11 – Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	40
Figura 12 – Teste do Labirinto em Y.....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Nado Forçado.....	45
Gráfico 2 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste de Suspensão da Cauda.....	46
Gráfico 3 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste de Preferência pela Solução de Sacarose.....	47
Gráfico 4 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Labirinto em Y	49
Gráfico 5 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de nitrito no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos.....	50
Gráfico 6 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de MDA no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos.....	52
Gráfico 7 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de GSH no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos.....	53
Gráfico 8 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Campo Aberto .....	44
Tabela 2 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrecorticotrófico
BDNF	Brain-derived neurotrophic fator
CAT	Catalase
CORT	Corticosterona
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DM	Depressão maior
EPM	Erro Padrão da Média
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FLU	Fluvoxamina
GR	Receptores Glicocorticóides
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSSG	Glutationa oxidada
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
ISRS	Inibidores seletivos da receptação de serotonina
LCE	Labirinto em cruz elevado
MDA	Malonildialdeído
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
RIP II	Riparina II
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Teste do Campo Aberto
TNF	Teste do Nado Forçado
Trk	Receptor cinase relacionado a tropomiosina
TSC	Teste de Suspensão da Cauda

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Aspectos gerais da depressão.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Fisiopatologia da depressão.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1</b>	<i>Estresse e depressão: ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA).....</i>	<b>19</b>
<b>1.2.2</b>	<i>Estresse oxidativo e depressão.....</i>	<b>21</b>
<b>1.2.3</b>	<i>Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).....</i>	<b>23</b>
<b>1.3</b>	<b>Modelo de depressão induzida por corticosterona.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4</b>	<b>Abordagem terapêutica da depressão.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5</b>	<b>Riparina II.....</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Material Botânico.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Drogas.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Animais.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>Princípios Éticos.....</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Desenho Experimental.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação Comportamental.....</b>	<b>35</b>
<b>4.6.1</b>	<i>Campo Aberto.....</i>	<b>35</b>
<b>4.6.2</b>	<i>Nado Forçado.....</i>	<b>36</b>
<b>4.6.3</b>	<i>Suspensão da Cauda.....</i>	<b>37</b>
<b>4.6.4</b>	<i>Preferência pela solução de sacarose.....</i>	<b>38</b>
<b>4.6.5</b>	<i>Labirinto em Cruz Elevado.....</i>	<b>39</b>
<b>4.6.6</b>	<i>Labirinto em Y.....</i>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação Neuroquímica.....</b>	<b>41</b>
<b>4.7.1</b>	<i>Dissecação das áreas cerebrais.....</i>	<b>41</b>
<b>4.7.2</b>	<i>Determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....</i>	<b>41</b>
<b>4.7.2.1</b>	<i>Determinação dos níveis de nitrito.....</i>	<b>41</b>

4.7.2.2	<i>Avaliação da peroxidação lipídica.....</i>	42
4.7.2.3	<i>Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).....</i>	42
4.7.3	<i>Dosagem de BDNF.....</i>	43
4.8	<b>Análise Estatística.....</b>	43
5	<b>RESULTADOS.....</b>	44
5.1	<b>Avaliação Comportamental.....</b>	44
5.1.1	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos ao teste do Campo Aberto.....</i>	44
5.1.2	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste do Nado Forçado.....</i>	44
5.1.3	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão da cauda.....</i>	45
5.1.4	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o comportamento do tipo anedonia em camundongos submetidos ao teste de Preferência pela Solução de Sacarose.....</i>	46
5.1.5	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o comportamento ansioso de camundongos submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado.</i>	47
5.1.6	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a memória de camundongos submetidos ao teste do Labirinto em Y.....</i>	48
5.2	<b>Avaliação Neuroquímica.....</b>	49
5.2.1	<i>Determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....</i>	49
5.2.1.1	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de nitrito no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos.....</i>	49
5.2.1.2	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de MDA no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos.....</i>	51
5.2.1.3	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de GSH no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos.....</i>	52
5.2.2	<i>Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos.....</i>	54
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	55
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	62
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	63
<b>ANEXO 1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA CEUA</b>		<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da depressão

A depressão é um transtorno comum e recorrente, sendo a principal causa de incapacidade no mundo (O'LEARY; DINAN; CRYAN, 2015). Estima-se que haja cerca de 350 milhões de pessoas afetadas no mundo todo. A depressão deve ser diferenciada de respostas emocionais normais a desafios da vida diária, já que, em casos mais graves, pode levar a problemas sérios, como o suicídio. Segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de 800.000 pessoas morrem a cada ano por suicídio, e esta é a segunda causa de morte de pessoas entre 15 e 29 anos (WHO, 2017).

A depressão apresenta-se cerca de duas a três vezes mais frequentemente em indivíduos do sexo feminino. Estudos apontam que cerca de um terço das mulheres terá um episódio de depressão ao longo da vida. Além disso, esse também é considerado um fator de risco para depressão resistente ao tratamento (KORNSTEIN; SCHNEIDER, 2001; KESSLER, 2003; FERRARI *et al.*, 2013; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2017).

O *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5) descreve nove sintomas da depressão: 1) humor deprimido, 2) prazer ou interesse diminuídos, 3) perda de apetite e/ou peso, 4) distúrbios do sono, 5) agitação ou retardo psicomotor, 6) fadiga e perda de energia, 7) sentimentos de culpa, 8) dificuldade de pensamento e concentração, 9) pensamentos recorrentes de morte e ideação suicida. Para que seja estabelecido o diagnóstico de depressão, o indivíduo deve apresentar cinco ou mais sintomas, dentre os quais devem estar o primeiro e/ou o segundo, e estes devem permanecer por pelo menos duas semanas (FRIED; NESSE, 2015; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2017).

A depressão é uma doença de alta complexidade principalmente pelo fato de que ela coexiste com outras condições psiquiátricas, como a ansiedade, levando o paciente a apresentar inclusive sintomas autonômicos, como tremor e palpitação. Segundo Dalrymple e Zimmerman (2007), os pacientes que apresentam desordens de ansiedade têm um desenvolvimento mais precoce da depressão, episódios depressivos mais longos, maior risco de suicídio, maior abuso e dependência de álcool e um pior desenvolvimento social e funcional, quando comparados aos indivíduos que apresentam apenas depressão (ADAMS *et al.*, 2016).

Embora ainda não se saiba com clareza os mecanismos envolvidos, a depressão

tem sido considerada fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças graves. Indivíduos depressivos apresentam risco aumentado de desenvolver cardiopatias – cerca de 1,5 vezes (KOOY *et al.*, 2007), diabetes mellitus - 1,26 a 1,37 vezes (KNOL *et al.*, 2006), doença de Alzheimer – 2,03 vezes (OWNBY *et al.*, 2006) e epilepsia – 3 a 7 vezes (HESDORFFER *et al.*, 2006), quando comparados a indivíduos não depressivos.

Esses dados mostram que a depressão é uma doença de alta complexidade e heterogeneidade, portanto, faz-se necessário investigar suas causas e características, para que sejam estabelecidos tratamentos mais eficazes.

## 1.2 Fisiopatologia da depressão

A fisiopatologia da depressão, embora muito estudada, ainda não se encontra totalmente elucidada. Diversas teorias têm sido propostas para explicar os mecanismos envolvidos na patogênese da depressão e acredita-se que sua etiologia seja resultado de anormalidades em fatores genéticos e ambientais (KRISHNAN; NESTLER, 2008), sendo o estresse o principal fator ambiental descrito na predisposição dos indivíduos à depressão (KELLER; NEALE; KENDLER, 2007; ANDREWS *et al.*, 2011; WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013). De fato, a maior parte dos episódios diagnosticados como depressão são precedidos por um evento estressante de natureza diversa. Em um estudo longitudinal, 88,1% dos casos diagnosticados foram relacionados a um estressor, enquanto apenas 11,9% tinham origem endógena (KELLER; NEALE; KENDLER, 2007).

Parece ser um consenso o envolvimento dos neurotransmissores monoaminérgicos na depressão. Serotonina e noradrenalina e, em menor extensão, dopamina, estão, direta ou indiretamente, relacionadas à depressão. Todos os antidepressivos descritos até o momento agem sobre as monoaminas por mecanismos diversos (KRISHNAN; NESTLER, 2008, ANDREWS *et al.*, 2011).

Pesquisas com roedores *knock out* para receptores monoaminérgicos ou com disfunção na transmissão monoaminérgica mostraram fortes evidências experimentais que as monoaminas têm papel importante nos sintomas depressivos e na resposta aos antidepressivos (HEISLER *et al.*, 1998; MAYORGA *et al.*, 2001; CRYAN *et al.*, 2004).

Os níveis de serotonina, noradrenalina e dopamina estão diminuídos nos cérebros de pacientes depressivos (SAPOLSKY, 2004), e, considerando que os níveis monoaminérgicos são regulados de forma homeostática (BEST; NIJHOUT; REED, 2010), o estresse altera, de forma ainda não totalmente esclarecida, os níveis dessas monoaminas

(ANDREWS *et al.*, 2011).

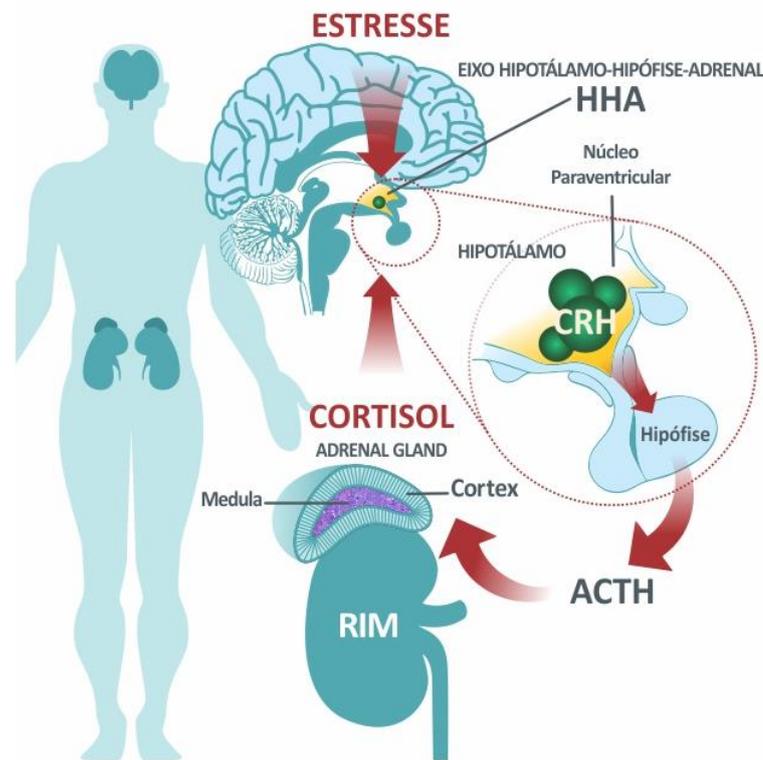
A teoria monoaminérgica, no entanto, não explica exhaustivamente as alterações encontradas na depressão. Por isso, diversas outras hipóteses têm sido desenvolvidas, que possam explicar com mais clareza as vias cerebrais envolvidas na fisiopatologia dos transtornos depressivos, incluindo o envolvimento das neurotrofinas, do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, do estresse oxidativo e da neuroinflamação (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

### ***1.2.1 Estresse e depressão: ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA)***

Estudos sugerem que a exposição ao estresse é um fator relacionado ao desenvolvimento da depressão (GOLD; CHROUSOS, 2002), já que quase 90% dos pacientes vivenciam eventos estressantes antes do início dos sintomas depressivos (KELLER; NEALE; KENDLER, 2007).

Fisiologicamente, a exposição a um fator estressante agudo ativa o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), resultando em uma cascata de eventos endócrinos. Essa cascata inclui a liberação e transporte do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (VP) de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo para a hipófise anterior, onde estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para a circulação sistêmica. O ACTH estimula a produção e liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) do córtex da adrenal para a circulação sistêmica (Figura 1). Uma vez liberados, os glicocorticóides agem nos tecidos periféricos e no cérebro, iniciando mudanças metabólicas e neuromodulatórias necessárias para lidar com o fator estressante. Essa cascata é controlada por retroalimentação negativa (MCEWEN, 2007; AGUILERA, 2011; WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013).

Figura 1 – Eixo hipotálâmico-hipofisário-adrenal



Fonte: Zuardi (2013).

Os receptores de glicocorticóides estão intimamente envolvidos no processo de retroalimentação negativa do eixo HHA. Quando estes receptores estão disponíveis em nível alto, a inibição por retroalimentação do núcleo paraventricular é aumentada e a atividade no eixo HHA é fortemente controlada. Contudo, quando estes receptores estão em nível baixo, a inibição por retroalimentação é ineficiente e o estímulo que provoca a resposta no eixo HHA permite um aumento, maior que o normal, nos níveis de cortisol (ANTONI, 1986; MCEWEN, 2007; AGUILERA, 2011; ZUNSZAIN *et al.*, 2011; VINCENT *et al.*, 2013).

A ativação prolongada do eixo HHA, pode apresentar um sério risco à saúde, podendo levar a imunossupressão, inibição do crescimento, distúrbios do sono, impedimento da memória, diminuição do comportamento sexual e disforia crônica (CONRAD *et al.*, 1996; MCEWEN, 1998; AMATO; RIZZI; MOLES, 2001).

O hipocampo é particularmente susceptível aos efeitos danosos do estresse prolongado, visto que possui grande densidade de receptores glicocorticóides. Esses efeitos danosos são evidenciados pela diminuição da ramificação dendrítica e diminuição da neurogênese, com possível redução do tamanho hipocampal (FUCHS, 2007; PHAM *et al.*, 2003; KANDEL *et al.*, 2014).

Inúmeras linhas de pesquisa revelam uma estreita conexão entre a excessiva ativação do eixo HHA e a depressão. Em cerca de 50% dos indivíduos com depressão, o sistema de retroalimentação negativa está comprometido, e o eixo HHA torna-se resistente à supressão, mesmo por potentes glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona (KANDEL *et al.*, 2014). Cerca de metade dos pacientes com depressão apresentam hipercortisolemia e ausência da liberação pulsátil do cortisol, que podem ser revertidos pelo tratamento com antidepressivos (HOLSBOER, 2001; STERNER; KALYNCHUK, 2010). Além disso, também foram observados aumento dos níveis de CRH no líquido cefalorraquidiano e aumento dos níveis urinários de cortisol em pacientes depressivos (NESTLER *et al.*, 2002; SOUTHWICK; CHARNEY, 2005).

Estudos recentes do grupo de Neurofarmacologia da Universidade Federal do Ceará evidenciaram que a administração crônica de corticosterona (hormônio equivalente ao cortisol) em camundongos resultou em comportamento do tipo depressivo e aumento do estresse oxidativo em áreas cerebrais, confirmando a teoria da disfunção do eixo HHA frente ao estresse crônico (SILVA *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015). Com isso, têm-se demonstrado o papel fundamental da disfunção do eixo HHA e dos níveis elevados de glicocorticoides na patogênese da depressão, sugerindo que este pode ser um alvo para as drogas antidepressivas (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

### **1.2.2 Estresse Oxidativo e Depressão**

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Nos processos naturais são produzidos radicais livres e outros fatores reativos, que podem interagir com diversos substratos, desempenhando funções como sinalização celular, respostas imunológicas e mitose (NG *et al.*, 2008). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) no organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Radicais livres consistem de estruturas químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, o que confere à molécula um estado altamente reativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). No entanto, as EROs e ERNs abrangem não somente radicais de oxigênio e nitrogênio, como superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila, óxido nítrico, mas também derivados que não são radicais, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

Em condições fisiológicas, as vias de defesa compensam a produção de EROs e

ERNs, entretanto, em condições de produção excessiva ou comprometimento das defesas do organismo, as EROs e ERNs poderão reagir com ácidos graxos, proteínas e DNA, causando dano a esses substratos (MAES *et al.*, 2011a).

Este desequilíbrio tem sido relacionado com a fisiopatologia de uma série de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, como depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer e Doença de Parkinson, visto que o cérebro é particularmente susceptível aos danos decorrentes do estresse oxidativo (JUNG *et al.*, 2007; BILICE *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2011). A susceptibilidade do cérebro decorre do alto teor de ácidos graxos insaturados, alto consumo de oxigênio e escassez dos sistemas de defesa antioxidantes (NG *et al.*, 2008).

O óxido nítrico (NO) é uma das principais ERNs e seus níveis podem ser mensurados indiretamente pela determinação de nitrito/nitrato, uma vez que o NO passa por várias reações em fluidos biológicos resultando na formação de nitritos e nitratos. O NO é uma molécula sintetizada a partir da L-arginina na presença do co-fator NADPH pela ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) de curta duração (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Evidências sugerem que ambas as isoformas da NOS, induzível e neuronal, participem de muitos processos neuronais importantes (DAWSON; SNYDER, 1994).

Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, quando em excesso, o NO pode exercer efeitos nocivos. Em determinadas condições, o NO e o  $O_2^-$  podem interagir, resultando na formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um produto altamente tóxico. Este composto é capaz de reagir com diversas moléculas: proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-os. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o radical OH<sup>-</sup> e o dióxido de nitrogênio, dentre outros, têm semelhante potencial deletério (RADENOVIC *et al.*, 2003; UZUM *et al.*, 2005).

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica. Esse processo ocorre quando as EROs reagem com ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e lipoproteínas, o que resulta na degradação de suas estruturas lipídicas. Em função disto, há perda da seletividade na troca iônica, com falha no potencial de membrana, e eventual ruptura, com liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (BILICI *et al.*, 2001), como o malonildialdeído (MDA), usado como marcador biológico indicativo de estresse oxidativo e dano celular (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1990; DEVASAGAYAM *et al.*, 2003), podendo resultar em morte celular (MAES *et al.*,

2011a).

Em condições fisiológicas, o organismo dispõe de um sistema antioxidante que consegue neutralizar as EROs e ERNs, constituído por agentes de ação não enzimática e enzimática (HALLIWELL, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006). O sistema de defesa não enzimático é composto por reagentes exógenos, como vitaminas C e E e sais minerais, que são normalmente obtidos na alimentação (MAES *et al.*, 2011a).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px). Esta reduz o  $H_2O_2$  à água, mas para isso precisa da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). Para completar o ciclo, a enzima Glutathione Redutase (GR) reduz a molécula de GSSG à sua forma reduzida em uma reação de oxidação de NADPH (KULAK *et al.*, 2013).

GSH é a principal defesa antioxidante da célula e está intimamente relacionada ao equilíbrio do ciclo celular redox, sendo assim, a manutenção dos seus níveis é primordial para o bom funcionamento da célula e combate ao estresse oxidativo (KULAK *et al.*, 2013).

Diversos estudos relatam distúrbios oxidativos em pacientes deprimidos, incluindo dano oxidativo, com aumento de EROs e ERNs, e função enzimática dos sistemas antioxidantes diminuída (OCZAN *et al.*, 2004; NG *et al.*, 2008; MAES *et al.*, 2011b). O estresse oxidativo causa danos às proteínas e ao DNA no cérebro, levando à lesão e apoptose de neurónios. Além da peroxidação lipídica e da redução da atividade das enzimas antioxidantes, o estresse oxidativo também leva ao aumento do catabolismo dos neurotransmissores monoaminérgicos, mecanismos estes relacionados à fisiopatologia da depressão (BILICI *et al.*, 2001).

Além desses achados, outros estudos também demonstraram que a inibição das isoformas neuronal e induzível da NOS previne o aparecimento de sintomas da depressão em roedores e o desenvolvimento do modelo de depressão induzida por estresse (DHIR; KULKARNI, 2007; WANG; AN; ZHANG, 2008).

### **1.2.3 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e depressão**

A partir da observação da diminuição do volume do hipocampo e de outras áreas cerebrais de indivíduos depressivos, foi postulada uma hipótese para a patogênese da depressão envolvendo as neurotrofinas, que são fatores de crescimento que também regulam a plasticidade no cérebro (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

As neurotrofinas, ou fatores neurotróficos, são proteínas homodiméricas reguladoras da neurogênese, crescimento, diferenciação e plasticidade neuronal, morte celular e migração, estando relacionadas ainda à inflamação (DWIVEDI, 2009; PALLAVI *et al.*, 2013).

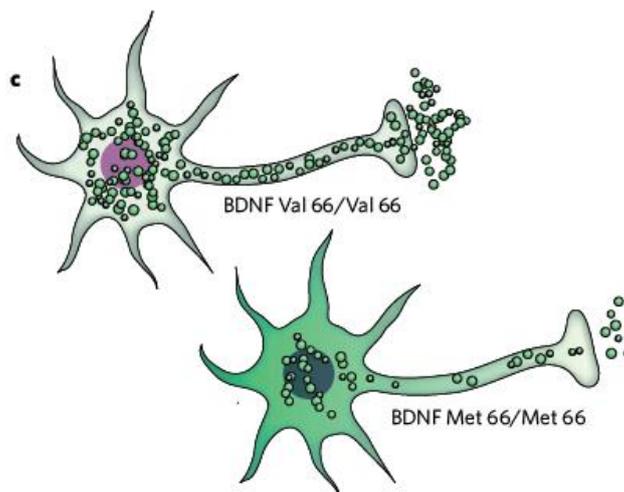
O BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) é a neurotrofina mais amplamente investigada e considerada a de maior importância. É encontrado amplamente no hipocampo, amígdala, neocórtex e cerebelo e exerce suas funções ligando-se principalmente ao receptor Trk (receptor cinase relacionado à tropomiosina) do subtipo TrkB, ligando-se também, em menor proporção, ao receptor p75 (LEVENTHAL *et al.*, 1999; NUMAKAWA *et al.*, 2010).

As neurotrofinas, em especial o BDNF, estão relacionadas aos importantes fenômenos de neurogênese e sinaptogênese, e a alteração na sua expressão e atividade (que pode ser decorrente de estresse, isquemia, convulsões, etc.) tem sido relacionada à patogênese de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, como depressão, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010; SHELINE, 2011; DESHMUKH; KNIERIM, 2012; BAI *et al.*, 2014).

A hipótese neurotrófica da depressão postula que a exposição crônica ao estresse resulta em diminuição da expressão e atividade de BDNF, levando ao prejuízo das funções de regiões límbicas, como emoção e aprendizado (DUMAN; MONTEGGIA, 2006). Estudos com modelos animais mostram que os antidepressivos são capazes de reverter esse quadro, aumentando os níveis de BDNF (SIUCIAK *et al.*, 1997; SOUSA *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015; GAWALI *et al.*, 2016).

A farmacoterapia com antidepressivos nem sempre é eficaz e apresenta altos índices de resistência. Estudos têm demonstrado que a resistência ao tratamento com os antidepressivos está relacionada a um polimorfismo no gene BDNF. Esse polimorfismo, que pode ser induzido pelo estresse, consiste na substituição do aminoácido valina por metionina no códon 66 do BDNF e mostrou alterar a expressão e o processamento de BDNF, como representado na Figura 2 (EGAN *et al.*, 2003; IBARGUEN-VARGAS *et al.*, 2009; SANCHEZ *et al.*, 2011; HOSANG *et al.*, 2014; EL-HAGE *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2017).

Figura 2 – Alteração na expressão de BDNF em decorrência do polimorfismo Val/Met



Fonte: Krishnan e Nestler (2008).

Portanto, o BDNF configura-se como uma ferramenta importante para a investigação dos mecanismos envolvidos na etiologia da depressão, bem como no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o seu tratamento.

### 1.3 Modelo de depressão induzida por corticosterona

Os modelos animais são ferramentas fundamentais para o estudo de doenças humanas, como a depressão. No entanto, é um desafio selecionar medidas qualitativas em animais que sejam correspondentes aos sintomas apresentados em humanos, visto que esses sintomas são, por vezes, subjetivos e variáveis. Além disso, alguns dos sintomas da depressão não podem ser medidos em animais, como é o caso da ideação suicida (WILLNER, 1984; DEUSSING, 2006).

Em roedores, vários achados indicaram que repetidas injeções de corticosterona induziram aspectos comportamentais e neuroquímicos da depressão, incluindo efeitos sobre a neurogênese (ZHAO, 2008a; MAO *et al.*, 2012), o metabolismo cerebral de monoaminas (INOUE; KOYAMA, 1996) e o comportamento tipo depressivo, como demonstrado no teste de nado forçado e de suspensão da cauda (IJIMA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

Com base nestes resultados, foi possível concluir que esse modelo animal é válido para o estudo da etiologia da depressão e para avaliar a eficácia de drogas antidepressivas (STERNER; KALYNCHUK, 2010), tendo sido apontado inclusive como um modelo animal

de depressão resistente ao tratamento (CALDARONE; ZACHARIOU; KING, 2015) e de depressão psicótica primária (IJIMA *et al.*, 2010).

#### **1.4 Abordagem terapêutica da depressão**

O tratamento da depressão envolve não apenas fármacos antidepressivos, mas também intervenções comportamentais e medidas psicoterapêuticas. Estudos evidenciaram a relação entre hábitos de vida não saudáveis e o aparecimento de sintomas depressivos (HIDAKA, 2012). Desse mesmo modo, dietas balanceadas, realização de exercícios físicos, cuidados com a qualidade do sono e o não uso de bebidas alcoólicas têm sido descritos como auxiliares no tratamento da depressão. Além disso, muitos estudos têm demonstrado a importância da terapia com música, animais e exercícios de relaxamento como coadjuvantes no tratamento dos sintomas depressivos (ERKKILA *et al.*, 2011; BENTLEY; PAGALILAUAN; SIMPSON, 2014; KAMIOKA *et al.*, 2014).

A psicoterapia no tratamento da depressão já é bastante estudada. Os métodos, que incluem terapia cognitivo-comportamental, psicoterapia interpessoal, terapia de resolução de problemas, psicodinâmica, têm mostrado eficácia no tratamento da depressão (CUIJPERS *et al.*, 2008).

Apesar de todas as opções terapêuticas como coadjuvantes no tratamento da depressão, a utilização de fármacos é necessária na maioria dos casos. Os fármacos antidepressivos utilizados até hoje ainda apresentam falhas, como efeitos adversos e demora no início dos efeitos. Apesar disso, desde as primeiras classes de antidepressivos descritos, muitos avanços já ocorreram, garantindo a descoberta de fármacos cada vez mais seguros e eficazes (MORENO *et al.*, 1999; KRISHNAN, NESTLER, 2008; O'LEARY; DINAN; CRYAN, 2015).

A primeira classe de antidepressivos descoberta foi a dos inibidores da monoaminoxidase (IMAO), já na década de 50. Seu mecanismo na depressão consiste no bloqueio da isoforma A da enzima monoaminoxidase, responsável pela degradação dos neurotransmissores monoaminérgicos. No entanto, seus efeitos adversos levaram à busca de novas drogas. Como exemplo de fármacos dessa classe, tem-se a fenelzina e a tranilcipromina (MORENO *et al.*, 1999; STAHL, 2014).

Outra classe de fármacos largamente utilizada é a dos antidepressivos tricíclicos (ADT), cujo mecanismo consiste em bloquear a recaptação de monoaminas, principalmente noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), e, em menor proporção, dopamina (DA). O

bloqueio de outros receptores, como histaminérgicos, alfa-adrenérgicos e muscarínicos está relacionado aos seus efeitos adversos (hipotensão ortostática, sedação, constipação, xerostomia). Os principais exemplos de fármaco são amitriptilina e nortriptilina (MORENO *et al.*, 1999; STAHL, 2014).

Os inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) estão entre os fármacos de escolha para o tratamento da depressão. Possuem baixa afinidade por receptores histaminérgicos, adrenérgicos e muscarínicos, diminuindo assim os efeitos adversos encontrados nos ADT (MORENO *et al.*, 1999; STAHL, 2014). Entre os ISRS, a fluvoxamina tem-se destacado como critério de escolha no tratamento de alguns subtipos de depressão, inclusive em depressões severas (OTTEVANGER, 1991). Tem-se utilizado a fluvoxamina também no tratamento dos transtornos de ansiedade, entre eles, o transtorno obsessivo-compulsivo (MUNDO *et al.*, 2001), a ansiedade generalizada, a fobia social, o transtorno de estresse pós-traumático e os estados mistos de ansiedade e depressão (LAWS *et al.*, 1990), além da depressão maior com ansiedade comórbida (SONAWALLA *et al.*, 1999) e como monoterapia na depressão psicótica (FURUSE; HASHIMOTO, 2009).

Del Porto *et al.* (2007) em seu estudo, utilizando fluvoxamina, confirmaram sua eficácia e tolerabilidade no tratamento do transtorno depressivo maior, assim como sua eficácia no tratamento das alterações do sono encontradas nos pacientes deprimidos. O perfil de eventos adversos foi o esperado para os ISRS, ressaltando-se o fato de que poucos pacientes relataram disfunção sexual (2,5% dos pacientes).

Os inibidores duplos da recaptação de serotonina e noradrenalina são uma classe mais recente de antidepressivos, capazes de inibir tanto o transportador de serotonina (SERT), quanto o de noradrenalina (NERT), possuindo baixa afinidade pelo de dopamina. Foram fármacos descobertos a partir da tentativa de melhorar o tratamento. A venlafaxina e a desvenlafaxina são fármacos pertencentes a essa classe (MORENO *et al.*, 1999; STAHL, 2014).

Buscando aumentar a eficácia e a tolerabilidade dos fármacos antidepressivos, foram desenvolvidos fármacos com mecanismos de ação distintos, dentre eles moclobemida, trazodona, bupropiona e mirtazapina (MORENO *et al.*, 1999; STAHL, 2014).

Embora com grandes avanços, a farmacoterapia da depressão ainda apresenta falhas, como presença de resistência ao tratamento, demora no início dos efeitos, bem como efeitos adversos (AMSTERDAM; HORNIG-ROHAN, 1996; MCINTYRE *et al.*, 2014). Esses fatores justificam a pesquisa de novas drogas que apresentem melhores características de segurança, eficácia e tolerabilidade, aumentando, assim, a adesão ao tratamento e a qualidade

de vida dos pacientes. Nesse contexto, os produtos naturais constituem uma grande fonte para o desenvolvimento de novas drogas (CARLSON, 2010).

### 1.5 Riparina II

A riparina II é um produto natural que foi isolado, pela primeira vez, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, e, desde então tem sido utilizada em diversos estudos para investigação de sua atividade biológica. É extraída do fruto não maduro da espécie *Aniba riparia* (Figura 3), uma planta da família Lauraceae, conhecida popularmente como louro amarelo e encontrada em diversos países como Peru, Equador e Colômbia. No Brasil, ocorre principalmente na região da Amazônia (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987; CASTELO-BRANCO, 2000).

Figura 3 – *Aniba riparia* (Nees) Mez



Fonte:

<http://fm2.fieldmuseum.org/vrrc/max/LAUR-anib-ripa-ecu-2188224.jpg> (acesso: 05/17)

Os frutos da *Aniba riparia* contêm diversos constituintes, dentre os quais flavonoides, neolignanas, stírilpironas e alcanidas (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). Esta última classe é de interesse de pesquisadores na busca de substâncias farmacologicamente ativas (CASTELO-BRANCO, 2000). Do fruto não maduro de *Aniba riparia* foram extraídas três alcanidas, as quais apresentaram ações biológicas, como descrito na Figura 4.

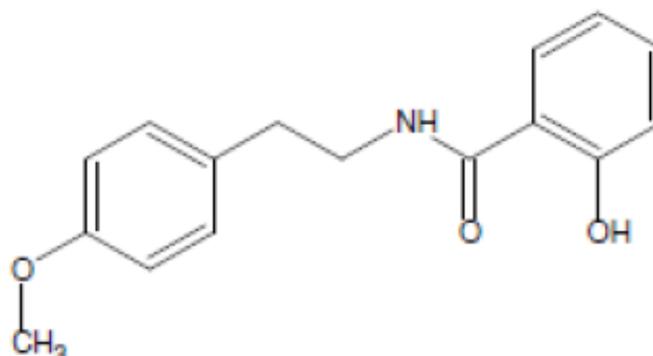
Figura 4 – Ações biológicas das riparinas

ALCAMIDA	ATIVIDADE BIOLÓGICA
Riparina I (O-metil-N-benzoil tiramina)	Anticonvulsivante (MONTEIRO <i>et al.</i> , 2005), Antimicrobiana (MARQUES, 2001), Miorrelaxante (MARQUES <i>et al.</i> , 2005), Hipotensor (SEIXAS, 1996), Antidepressiva, Ansiolítica (SOUSA <i>et al.</i> , 2005), Antinociceptivo (ARAUJO <i>et al.</i> , 2009)
Riparina II (O-metil-N-2 hidroxil benzoil tiramina)	Anticonvulsivante (LEITE <i>et al.</i> , 2006), Antimicrobiana (MARQUES, 2001), Relaxante de traqueia de cobaia (CASTELO BRANCO <i>et al.</i> , 2000), Hipotensor (SEIXAS, 1996), Antidepressivo (TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2013), Ansiolítico (SOUSA <i>et al.</i> , 2007), Anti-inflamatório (CARVALHO <i>et al.</i> , 2013)
Riparina III (O-metil-N-2,6- dihidroxil benzoil tiramina)	Anticonvulsivante (MONTEIRO <i>et al.</i> , 2005), Espasmódico (THOMAS <i>et al.</i> , 1994); Miorrelaxante (MARQUES <i>et al.</i> , 2005), Antimicrobiana (MARQUES, 2001), Hipotensor (SEIXAS, 1996), Antinociceptivo e anti-inflamatório (VASCONCELOS, 2015), Antidepressivo (SOUSA <i>et al.</i> , 2004; MELO <i>et al.</i> , 2013; VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2015), Ansiolítico (MELO <i>et al.</i> , 2006; SOUSA <i>et al.</i> , 2004)

Fonte: Carvalho (2016).

A riparina II (O-metil)-N-2(hidroxibenzoil) tiramina é formada pela união da tiramina (uma feniletilamina) e do ácido benzoico. Apresenta uma hidroxila no anel do ácido benzoico e um metil ligado ao oxigênio, formando uma função éter, no anel da tiramina (Figura 5). A tiramina é uma amina simpaticomimética de ação indireta que causa liberação de catecolaminas armazenadas (STAHL, 2014).

Figura 5 – Estrutura química da riparina II



Fonte: Castelo-Branco (1992).

Em estudos recentes do nosso grupo, riparina II, administrada agudamente, apresentou efeitos sobre o Sistema Nervoso Central, incluindo atividade ansiolítica, antidepressiva e antioxidante, além de anti-inflamatória e antinociceptiva (SOUSA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2013; CARVALHO, 2016).

O efeito antidepressivo parece ser mediado por uma interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D1 e D2), noradrenérgico (receptor  $\alpha 1$ ) e serotoninérgico (receptor 5-HT<sub>1A</sub>). O efeito antioxidante é relacionado à melhora dos sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos e à redução da peroxidação lipídica (TEIXEIRA, 2013).

Em avaliação pré-clínica, RIP II apresentou baixa toxicidade *in vitro*, quando avaliada em linhagens de fibroblastos e macrófagos. *In vivo*, RIP II mostrou ser segura em camundongos, pois não apresentou efeitos nocivos em testes de toxicidade aguda e crônica, apresentando DL50 superior a 2000mg/kg (SILVEIRA, 2007; CARVALHO, 2016).

Embora a atividade antidepressiva da RIP II tenha sido observada em modelo animal de estresse agudo, seus mecanismos em modelos animais de estresse crônico ainda não foram estudados. Desse modo, nosso objetivo foi investigar os efeitos da riparina II em modelo crônico de depressão, bem como o envolvimento do fator neurotrófico, acreditando que essa substância de origem natural pode ser útil no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a depressão.

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A depressão é uma doença grave, crônica e incapacitante, que compromete a qualidade de vida do indivíduo e de sua família. A depressão está entre os transtornos psiquiátricos mais comuns do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 350 milhões de pessoas vivem com depressão (O'LEARY; DINAN; CRYAN, 2015; OMS, 2017).

A investigação das vias envolvidas na fisiopatologia da depressão constitui-se um desafio, visto que não existe um modelo animal que represente exatamente e concomitantemente as características da depressão, pois alguns dos sintomas, como culpa, baixa autoestima e ideação suicida, são subjetivos e variáveis, tornando difícil investigá-los em animais (DEUSSING, 2006). Nesse contexto, o modelo animal de depressão induzida por corticosterona é considerado uma ferramenta útil para a investigação da etiologia da depressão e para a avaliação da eficácia de fármacos antidepressivos (STERNER; KALYNCHUK, 2010), reproduzindo, ainda que de maneira limitada, a grande dificuldade da farmacoterapia da depressão: a resistência ao tratamento (CALDARONE; ZACHARIOU; KING, 2014)

Apesar dos avanços no conhecimento da neurobiologia da depressão e no desenvolvimento de fármacos, os antidepressivos presentes no mercado atualmente ainda têm seu mecanismo baseado na clássica hipótese monoaminérgica da depressão. Embora proporcionem melhora no quadro dos pacientes, são drogas com início de ação lento e com muitos efeitos adversos, além da resistência ao tratamento, que ainda alcança altos índices (MORENO *et al.*, 1999; O'LEARY; DINAN; CRYAN, 2015). Nesse contexto, os produtos naturais constituem uma grande fonte para o desenvolvimento de novas drogas (CARLSON, 2010). Em estudos recentes do nosso grupo, riparina II, uma alcanida isolada de *Aniba riparia*, apresentou, quando administrada agudamente, efeitos sobre o Sistema Nervoso Central, incluindo atividade ansiolítica, antidepressiva e antioxidante, além de anti-inflamatória e antinociceptiva (SOUSA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2013; CARVALHO, 2016).

Diante do rico potencial farmacológico da riparina II e de sua atividade antidepressiva, já demonstrada em modelos animais de estresse agudo, foi dada continuidade à investigação do efeito antidepressivo da RIP II, utilizando o modelo de depressão induzida por corticosterona no presente estudo. Nessa perspectiva, pretendeu-se investigar, mais detalhadamente, o efeito antidepressivo de RIP II, com ênfase na hipótese neurotrófica da depressão.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Geral**

Estudar o efeito da riparina II na reversão de alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona.

#### **3.2 Específicos**

- ✓ Avaliar a indução do estado depressivo pelo modelo de administração crônica de CORT em camundongos por meio do teste do nado forçado
- ✓ Avaliar a influência de RIP II e CORT na atividade locomotora de camundongos por meio do teste do campo aberto
- ✓ Observar o efeito da RIP II na reversão das alterações comportamentais de desamparo aprendido por meio dos testes de nado forçado e suspensão da cauda em camundongos submetidos à exposição crônica de CORT
- ✓ Avaliar o efeito da RIP II na reversão da anedonia provocada pela administração crônica de CORT em camundongos por meio do teste de preferência pela solução de sacarose
- ✓ Observar o efeito da RIP II na reversão do comportamento ansioso provocado por CORT em camundongos por meio do labirinto em cruz elevado
- ✓ Investigar o efeito do tratamento com RIP II sobre as alterações de memória induzidas por CORT em camundongos por meio do labirinto em Y
- ✓ Avaliar parâmetros de estresse oxidativo (MDA, nitrito e GSH) no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos expostos a CORT e tratados com RIP II
- ✓ Investigar o efeito da RIP II sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos à administração crônica de CORT

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material Botânico

Os frutos verdes da *Aniba Riparia* foram coletados na região de Humaiatá, estado do Amazonas, Brasil (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987) e cedidos ao Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. A extração e o isolamento da RIP II foram feitos pelo Prof. Dr Stanley Juan Chavez Gutierrez da Universidade Federal do Piauí. Inicialmente, a riparina II foi isolada e purificada por cromatografia em camada delgada e a sua estrutura foi confirmada por Ressonância Magnética Nuclear. A pureza foi determinada por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência, determinando um grau de pureza de 99% (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987).

### 4.2 Drogas

Todas as drogas a seguir foram administradas em um volume de 0,1 mL/10 g de peso do animal.

- Corticosterona [20 mg/kg, por via subcutânea (s.c.), Sigma, St. Louis, EUA] foi dissolvida em solução salina, contendo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,1% de Tween 80.
- Riparina II [50 mg/kg, via oral (v.o.)], Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, João Pessoa-PB, Brasil] foi dissolvida em 2% de Tween 80 e diluída em água destilada. A escolha da dose utilizada foi baseada nos resultados prévios de Teixeira (2013).
- Fluvoxamina [Luvox® 50 mg/kg, via oral (v.o.)] foi diluída em água destilada.

### 4.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, pesando entre 22 e 26 g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo claro/escuro alternado de doze horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

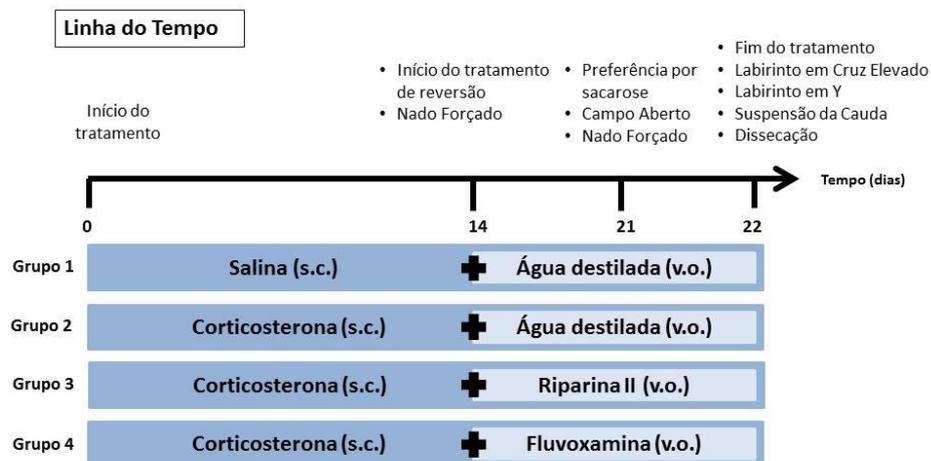
#### 4.4 Princípios Éticos

Os experimentos foram realizados após aprovação do projeto (Nº protocolo: 103/2015) (Anexo 1) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará. Os protocolos experimentais seguiram os princípios éticos aceitos pelo *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH, 1996). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais usados nos experimentos.

#### 4.5 Desenho Experimental

Uma visão geral do desenho experimental está ilustrada na Figura 6. Os grupos de animais (cerca de 8 animais por grupo) receberam uma injeção diária de corticosterona 20 mg/kg ou de veículo, s.c., durante 22 dias, sendo administrado adicionalmente a partir do 14º dia de tratamento, veículo (água destilada) ou RIP II (50 mg/kg) ou FLU (50 mg/kg) por oito dias, 1 hora após a administração do hormônio de estresse. Os resultados comportamentais foram registrados no 14º (Nado Forçado), 21º (Preferência por sacarose, Nado Forçado, Campo aberto), e 22º (Labirinto em Cruz Elevado, Labirinto em Y, Suspensão da Cauda) dias de tratamento, 1 hora após a última administração das substâncias. No 22º dia, após 1 hora dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados e as áreas cerebrais foram dissecadas para realização das análises neuroquímicas.

Figura 6 - Representação esquemática do desenho experimental



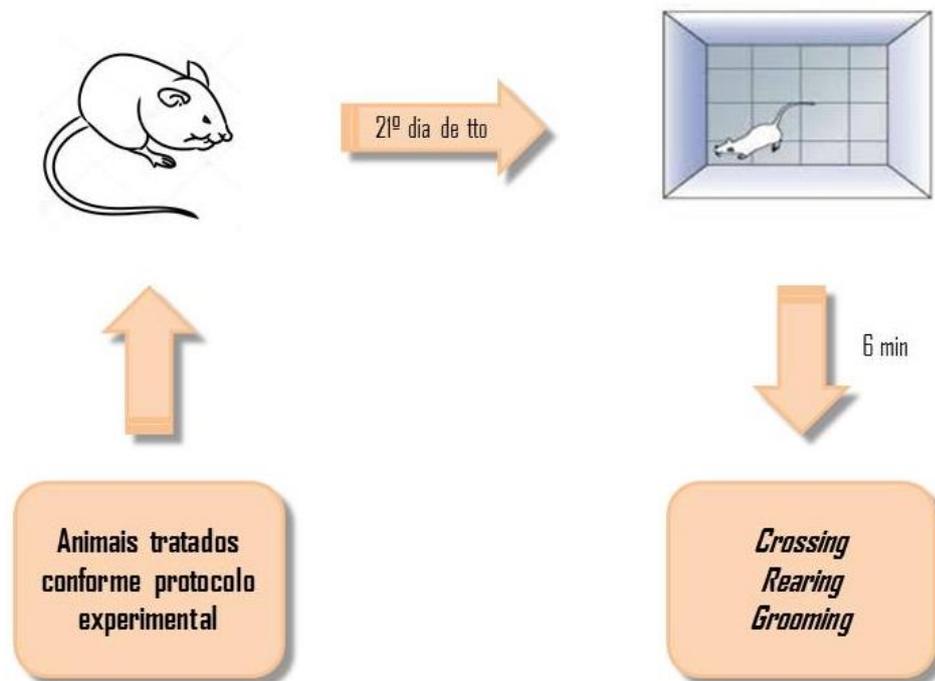
Fonte: elaborado pela autora da pesquisa

## 4.6 Avaliação Comportamental

### 4.6.1 Campo Aberto

Este teste foi utilizado para avaliar a atividade locomotora do animal e a influência das drogas sobre esta. Foi utilizado um aparato em acrílico (paredes transparentes e fundo preto, dimensões 30x30x15), dividido em 9 quadrantes. Como representado na figura 7, o animal foi colocado no centro do aparato e, durante seis minutos, foram observados os seguintes parâmetros: número de *crossings* (cruzamento entre os quadrantes), número de *rearings* (ficar de pé sobre as patas traseiras) e número de *groomings* (movimento de auto-limpeza). O aparato foi higienizado com álcool 10% após avaliação de cada animal (ARCHER, 1973).

Figura 7 – Teste do Campo Aberto



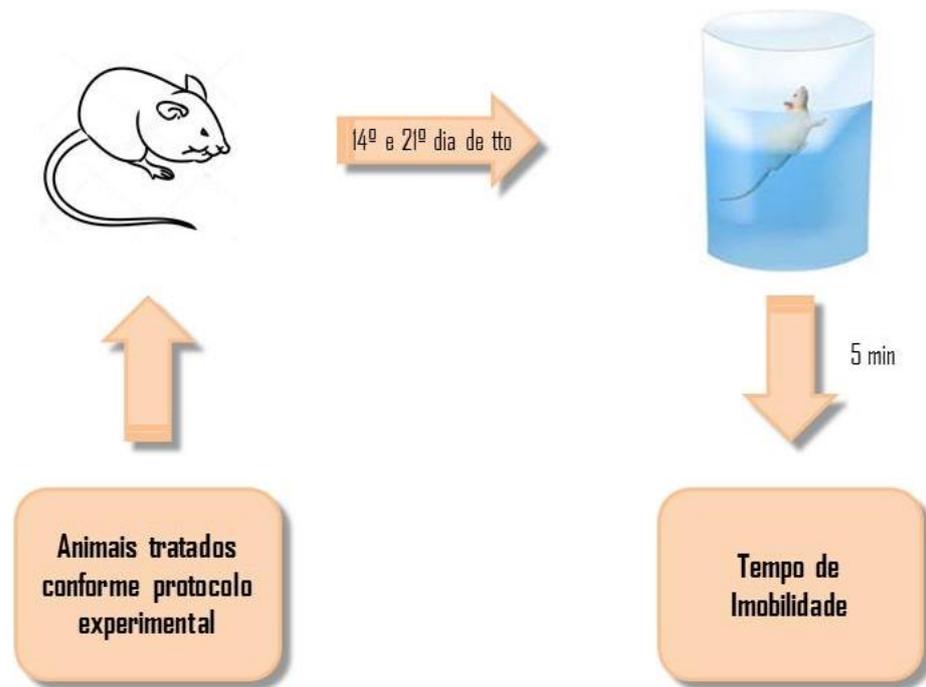
Fonte: elaborado pela autora da pesquisa.

### 4.6.2 Nado Forçado

Teste utilizado para avaliar o potencial antidepressivo da RIP II após indução do estresse por corticosterona. Foi realizado de acordo com o modelo de Porsolt *et al.* (1978)

com poucas modificações. Os animais foram colocados no cilindro com água, e a duração total da imobilidade (em segundos) foi registrada durante cinco minutos por um observador cego ao tratamento dado a cada animal. O camundongo foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando passivamente, podendo fazer até leves movimentos para manter a cabeça fora da água (Figura 8).

Figura 8 – Teste do Nado Forçado

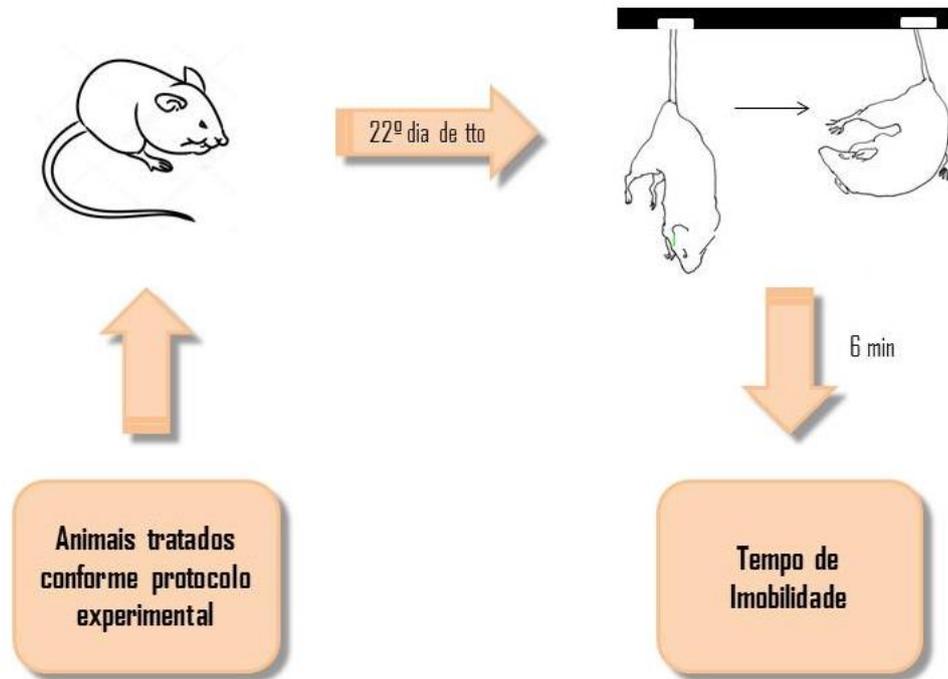


Fonte: elaborado pela autora da pesquisa.

#### 4.6.3 Suspensão da Cauda

O teste de suspensão da cauda (STERU *et al.*, 1985) também foi utilizado para avaliar o potencial antidepressivo da RIP II. Nesse teste, cada camundongo foi suspenso pela cauda a uma plataforma, 58 cm acima da bancada. O camundongo foi fixado no seu lugar por meio de uma fita adesiva, colocada cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda (Figura 9). O tempo durante o qual os animais permaneceram imóveis, ao longo de um período de seis minutos, foi registrado. Cada animal foi submetido a este teste apenas uma vez.

Figura 9 – Teste de Suspensão da Cauda



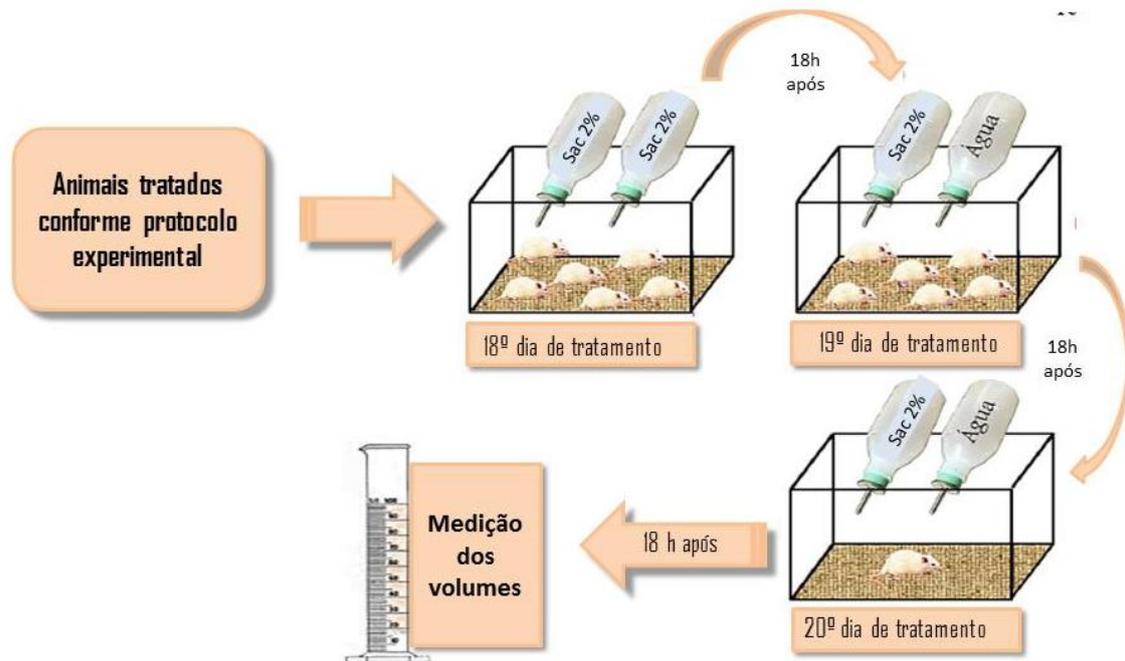
Fonte: elaborado pela autora da pesquisa

#### 4.6.4 Preferência pela solução de sacarose

A anedonia foi avaliada por meio do teste de preferência pela solução de sacarose. O teste foi realizado como descrito por Mao *et al.* (2014) com pequenas modificações. Antes do teste, os camundongos foram treinados para se adaptar a uma solução de sacarose (2%, v/v) colocando-se dois frascos de uma solução de sacarose, durante 18 horas; em seguida, uma das garrafas foi substituída por água durante 18 horas. Após a adaptação, para a realização do teste, os animais foram colocados em gaiolas individuais e receberam a opção de uma garrafa contendo 100 mL de água e outra contendo 100 mL de sacarose (2%, v/v), durante 18 horas (Figura 10). O teste foi realizado no período da noite sem privação de comida. Ao final do teste, foram determinados o consumo de água e a porcentagem de preferência pela solução de sacarose a qual foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Preferência de sacarose (\%)} = \frac{\text{consumo de sacarose}}{\text{consumo de água} + \text{consumo de sacarose}} \times 100$$

Figura 10 – Teste de Preferência pela Solução de Sacarose

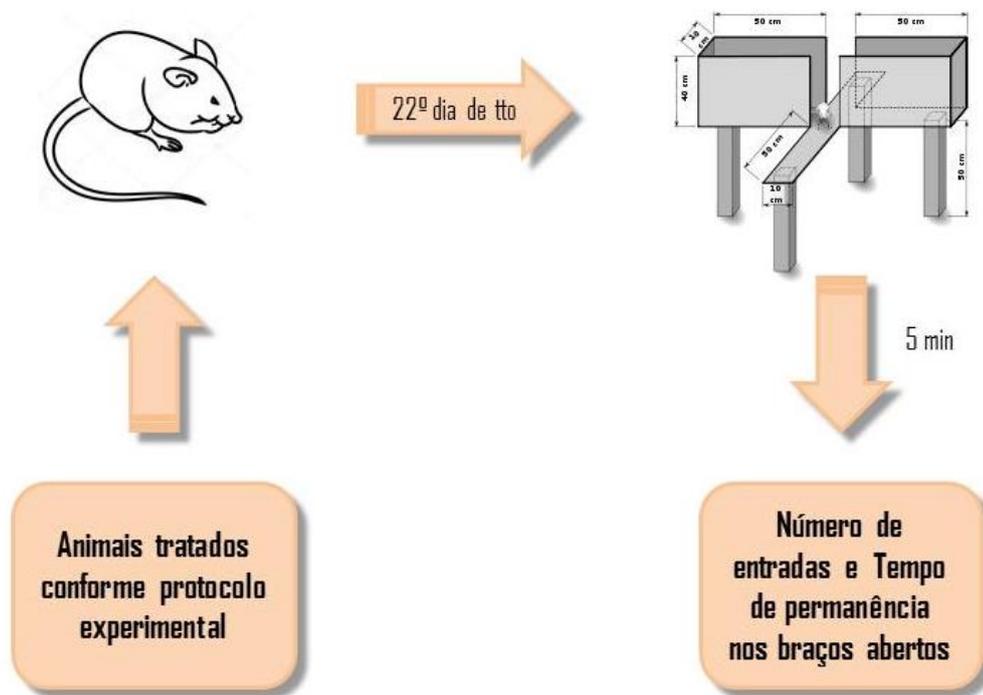


Fonte: adaptado de Sousa (2015).

#### 4.6.5 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Esse é um teste utilizado para avaliação da atividade ansiolítica de uma substância (LISTER, 1987). O aparato é composto por dois braços abertos opostos (50 x 10 cm cada um) e dois fechados (50 x 10 x 30 cm), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 50 cm do nível do chão. Para o teste, os camundongos foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por cinco minutos (Figura 11). O padrão de medida da ansiedade foi a proporção de tempo total gasto nos braços abertos. O número de entradas nos braços abertos e fechados também foi utilizado como medida de atividade ou tendência exploratória.

Figura 11 – Teste do Labirinto em Cruz Elevado



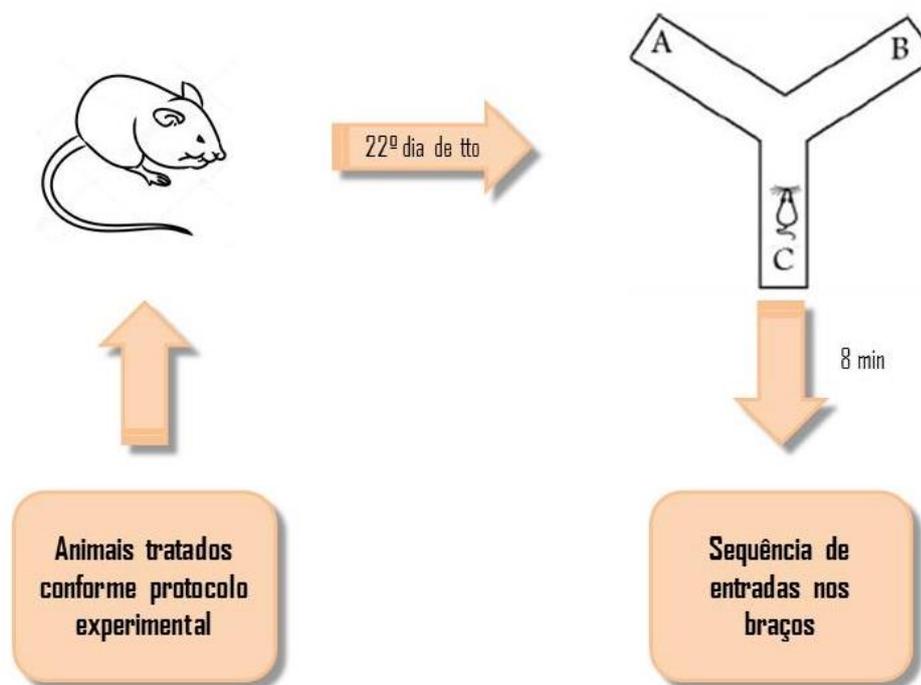
Fonte: elaborado pela autora da pesquisa.

#### 4.6.6 Teste do Labirinto em Y

A memória operacional e o aprendizado foram avaliados por meio do teste de labirinto em Y (SARTER, 1988). O labirinto consiste em três braços idênticos (A,B,C) de 40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura cada um convergindo a um ângulo igual. Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por oito minutos (Figura 12). A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entrada nos braços sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado. Por exemplo, se o animal fez o trajeto ABCACBACCAB, o número de entradas será 11 e as alternâncias corretas ABC, BCA, ACB, CBA, BAC, CAB. Portanto, a porcentagem de alternâncias corretas, de acordo com a fórmula abaixo, será  $[6/(11 - 2)] \times 100 = 66.7\%$ .

$$\text{Alternâncias corretas (\%)} = \frac{\text{alternâncias corretas}}{\text{número total de entradas} - 2} \times 100$$

Figura 12 – Teste do Labirinto em Y



Fonte: elaborado pela autora da pesquisa.

## 4.7 Testes Neuroquímicos

### 4.7.1 Dissecação das áreas cerebrais

Os animais foram sacrificados por decapitação e os cérebros foram retirados e rapidamente colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. As áreas cerebrais foram retiradas para o preparo dos homogenatos utilizados das dosagens neuroquímicas. Para a dosagem de BDNF, foi utilizado o hipocampo. Para a determinação de parâmetros de estresse oxidativo, foram utilizados córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo. Ao final da dissecação, as áreas foram armazenadas em *eppendorfs* devidamente identificados, pesados e conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

## 4.7.2 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

### 4.7.2.1 Determinação da concentração de nitrito

Para avaliar os efeitos do tratamento com as respectivas drogas na produção de NO, foi determinada a concentração de nitrito nos homogenatos, pelo método de Green et al. (1981). Para esse experimento 100 µL do Reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%, NEED 0,1% e água destilada) foram adicionados a 100 µL do sobrenadante do homogenato e incubados a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do Reagente de Griess a 100 µL do tampão usado para o homogenato (fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4). A absorbância foi medida em leitor de microplacas em 540 nm, e o resultado expresso em µmol de nitrito/g de tecido.

### 4.7.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA), conforme o método de Huang *et al.* (1998), seguindo o protocolo a seguir.

Foram preparados os homogenatos das áreas cerebrais a 10% em tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e 63µL destes foram adicionados a 100 µL de ácido perclórico 35% em tubos *ependorf*, que foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida 150 µL do sobrenadante foram adicionados a 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, que ficaram em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Por fim, 150 µL da mistura foram adicionados aos poços da placa de ELISA e, posteriormente, foi feita a leitura a 535nm. Os resultados foram expressos em µg de MDA/g de tecido.

### 4.7.2.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de GSH foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. Foram retirados 400µL do homogenato e adicionados a 320µL de água

destilada e mais 80µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foram recolhidos 400µL do sobrenadante e acrescidos 800µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20µL de DTNB 0,01M aos poços da placa de ELISA e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração a 412nm (SEDLAK *et al.*, 1968). A concentração de glutatona reduzida foi expressa em µg de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

#### **4.7.3 Dosagem de BDNF**

A concentração de BDNF foi determinada no hipocampo, homogeneizado a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 com adição de inibidor de protease (Sigma-Aldrich). A dosagem de BDNF em cada amostra foi feita por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para BDNF por 18h em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200µL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100µL das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg de BDNF/g de tecido.

#### **4.8 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, EUA). Os dados foram analisados a partir da utilização de ANOVA (*one-way*), seguido de Newman Keuls (*teste post hoc*), para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação Comportamental

#### 5.1.1 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos ao teste do Campo Aberto

O teste do Campo Aberto, realizado com o objetivo de avaliar possíveis alterações na atividade locomotora dos animais, mostrou, como pode ser visto na Tabela 1, que não houve diferença significativa entre os animais tratados com CORT, RIP II ou FLU quando comparados ao grupo controle, em nenhum dos três parâmetros analisados: nº *crossing* [ $F(3, 39) = 2,22$ ;  $p > 0,05$ ]; nº *grooming* [ $F(3, 43) = 1,65$ ;  $p > 0,05$ ] e nº *rearing* [ $F(3, 38) = 2,26$ ;  $p > 0,05$ ]. As drogas utilizadas não foram capazes de alterar a capacidade locomotora dos animais.

Tabela 1 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Campo Aberto

<b>GRUPO</b>	<b>Nº CROSSING</b>	<b>Nº REARING</b>	<b>Nº GROOMING</b>
<b>CONTROLE</b>	38.00 ± 4.692	4.273 ± 1.613	2.583 ± 0.4167
<b>CORT</b>	38.42 ± 3.283	6.909 ± 1.745	1.538 ± 0.2683
<b>CORT + RIP II</b>	41.57 ± 3.766	3.857 ± 1.353	2.000 ± 0.4226
<b>CORT + FLU</b>	29.31 ± 2.400	2.154 ± 0.6489	2.286 ± 0.3385

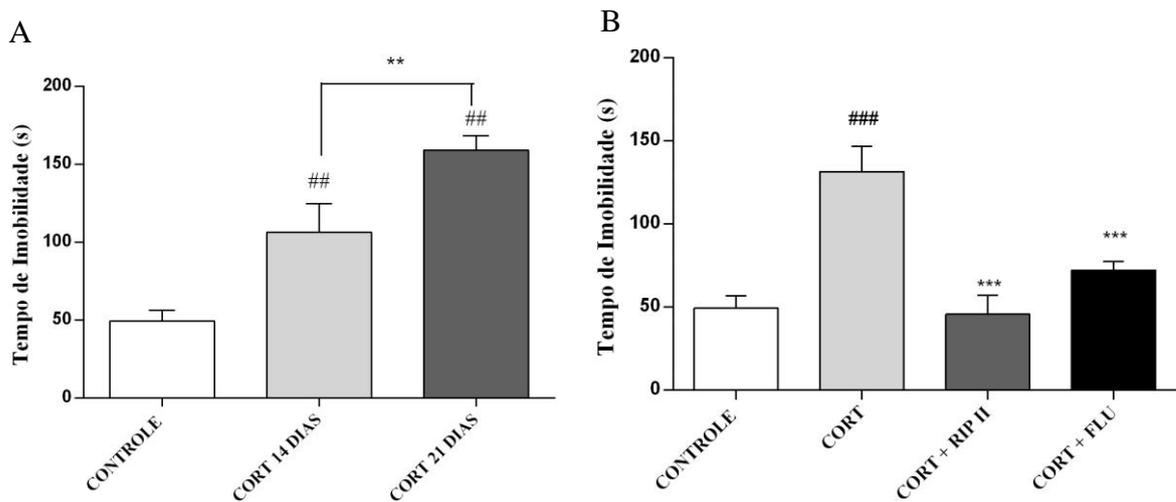
Resultados expressos como média ± EPM (n=8-10 animais/grupo). Não houve diferenças significativas de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

#### 5.1.2 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste do Nado Forçado

Como representado no Gráfico 1A, injeções repetidas de corticosterona por 14 e 21 dias, produziram um aumento no tempo de imobilidade dependente do tempo no teste do Nado forçado [ $F(2, 20) = 27,67$ ]. No Gráfico 1B, ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos [ $F(3, 38) = 14,18$ ]. Houve um aumento no tempo imobilidade dos animais

submetidos à administração crônica de CORT quando comparados aos animais controle ( $p < 0,001$ ). A administração subcrônica de RIP II reverteu o aumento no tempo de imobilidade provocado por CORT ( $p < 0,001$ ), assim como o fez o antidepressivo padrão ( $p < 0,001$ ).

Gráfico 1 - Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Nado Forçado

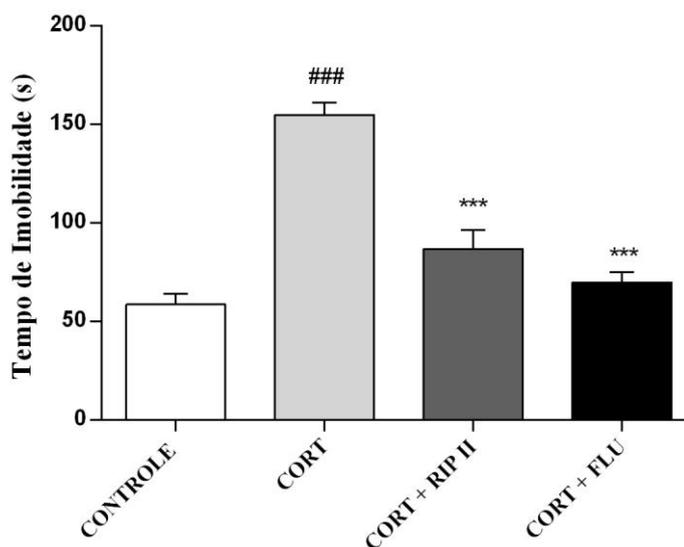


Cada coluna representa média  $\pm$  EPM ( $n=6-10$  animais/grupo). Valores significativos: \*\* $p < 0,01$  vs. CORT 14 dias; ## $p < 0,01$  vs. CONTROLE; ### $p < 0,001$  vs. CONTROLE; \*\*\* $p < 0,001$  vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

### 5.1.3 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste da Suspensão da Cauda

O tempo de imobilidade também foi avaliado no teste da Suspensão da Cauda. ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos [ $F(3, 34) = 45,58$ ]. Houve um aumento no tempo imobilidade dos animais submetidos à administração crônica de CORT quando comparados aos animais controle ( $p < 0,001$ ). A administração subcrônica de RIP II reverteu o aumento no tempo de imobilidade provocado por CORT ( $p < 0,001$ ), assim como o antidepressivo padrão ( $p < 0,001$ ), como representado no Gráfico 2:

Gráfico 2 - Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste da Suspensão da Cauda

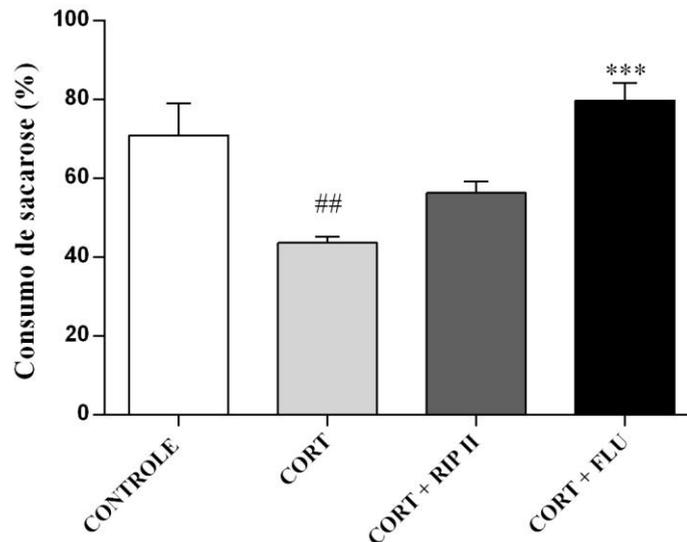


Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (n=6-10 animais/grupo). Valores significativos: ###p<0,001 vs. CONTROLE; \*\*\*p<0,001 vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

#### ***5.1.4 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o comportamento do tipo anedonia em camundongos submetidos ao teste de Preferência pela Solução de Sacarose***

No teste de Preferência pela Solução de Sacarose, houve diferença significativa entre os grupos analisados [ $F(3, 30) = 8,83$ ]. Os animais tratados com CORT apresentaram um comportamento do tipo anedonia, observado pela diminuição da preferência pela solução de sacarose quando comparada à água ( $p < 0,01$ ). O tratamento com o antidepressivo FLU foi capaz de reverter esse efeito ( $p < 0,001$ ), como pode ser visto no Gráfico 3, no entanto, o tratamento com RIP II não apresentou resultado estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

Gráfico 3 - Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste da Preferência pela Solução de Sacarose



Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (n=7-9 animais/grupo). Valores significativos: ##p<0,01 vs. CONTROLE; \*\*\*p<0,001 vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

### 5.1.5 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre o comportamento ansioso de camundongos submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os quatro parâmetros analisados no LCE foram: número de entradas nos braços abertos (NEBA) [F(3, 34) = 5,65], porcentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) [F(3, 40) = 12,7], tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) em segundos [F(3, 36) = 9,68] e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) [F(3, 37) = 5,86]. A administração de CORT diminuiu significativamente todos os parâmetros analisados. É possível observar pela Tabela 2 que esses parâmetros foram normalizados com a administração de RIP II e FLU.

Tabela 2 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Labirinto em Cruz Elevado

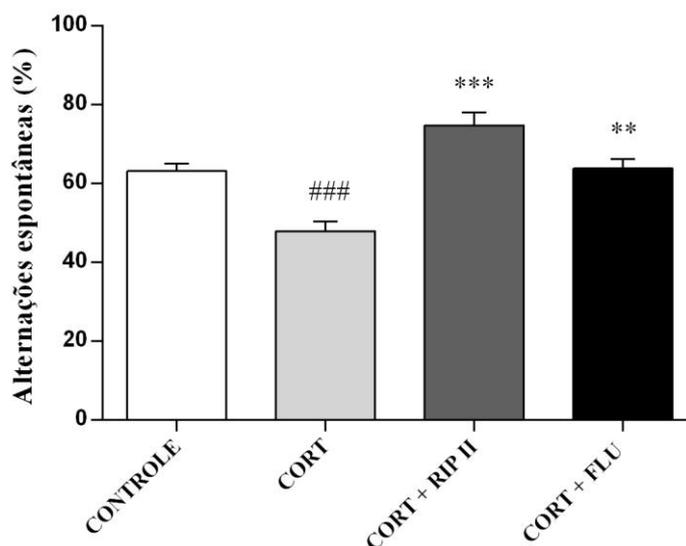
GRUPO	NEBA (n°)	PEBA (%)	TPBA (s)	PTBA (%)
CONTROLE	5.909 ± 0.5470	43.91 ± 2.479	95.00 ± 10.10	30.12 ± 3.938
CORT	3.667 ± 0.5270 <sup>#</sup>	29.59 ± 2.616 <sup>##</sup>	52.55 ± 6.109 <sup>##</sup>	25.31 ± 2.742
CORT + RIP II	6.143 ± 0.7047 <sup>*</sup>	57.96 ± 4.187 <sup>***</sup>	130.0 ± 11.01 <sup>**</sup>	47.57 ± 4.309 <sup>**</sup>
CORT + FLU	7.273 ± 0.7273 <sup>**</sup>	46.65 ± 3.679 <sup>***</sup>	99.73 ± 15.16 <sup>*</sup>	43.50 ± 4.329 <sup>**</sup>

Resultados expressos como média ± EPM (n=8-10 animais/grupo). Valores significativos: #p<0,05 vs. CONTROLE; ##p<0,01 vs. CONTROLE; \*p<0,05 vs. CORT; \*\*p<0,01 vs. CORT; \*\*\*p<0,001 vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido do teste *post hoc* de Newman–Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona; NEBA = número de entrada nos braços abertos; PEBA = porcentagem de entrada nos braços abertos; TPBA = tempo de permanência nos braços abertos; PTBA = porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos.

#### 5.1.6 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a memória de camundongos submetidos ao teste do Labirinto em Y

Na avaliação da memória operacional, os animais que receberam CORT exibiram uma diminuição significativa na porcentagem de alternações corretas no labirinto em Y, quando comparados aos animais controle (p<0,001). No entanto, a administração de RIP II (p<0,001) foi capaz de reverter as alterações causadas por CORT [F(3, 28) = 14,80], de modo ainda mais significativo que FLU (p<0,01), como representado no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no teste do Labirinto em Y



Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (n=8-10 animais/grupo). Valores significativos: ###p<0,001 vs. CONTROLE; \*\*p<0,01 vs. CORT; \*\*\*p<0,001 vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

## 5.2 Avaliação Neuroquímica

### 5.2.1 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

#### 5.2.1.1 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a concentração de nitrito no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos

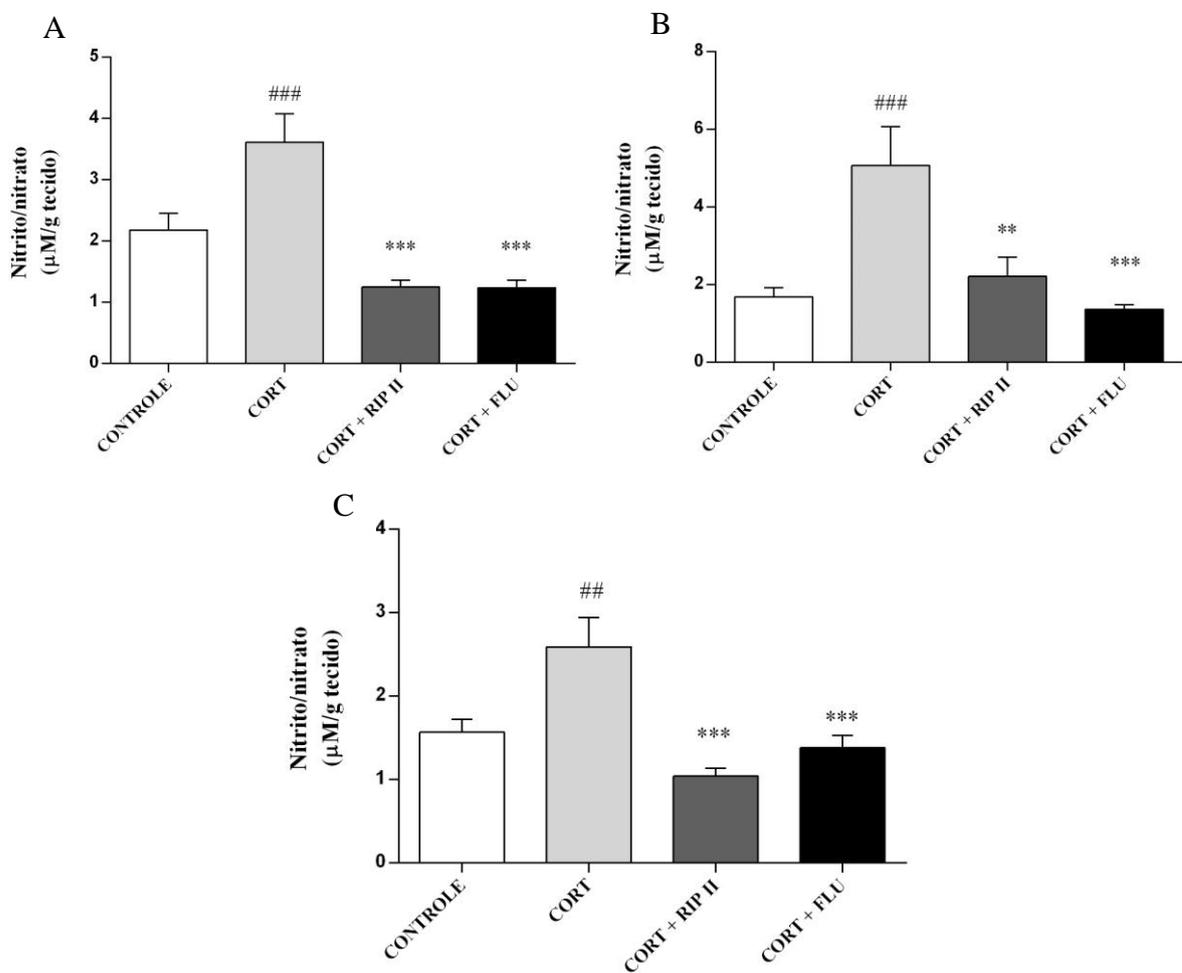
A concentração de nitrito foi significativamente aumentada no córtex pré-frontal dos camundongos que receberam apenas CORT, quando comparados ao grupo controle (p<0,001). O tratamento com RIP II (p<0,001), bem como com o antidepressivo FLU (p<0,001), foram capazes de diminuir significativamente essa concentração, como pode ser visto no Gráfico 5A [F(3, 26) = 17,41].

No corpo estriado, também houve diferença significativa entre os grupos [F(3, 22) = 10,12]. O Gráfico 5B mostra o aumento significativo da concentração de nitrito como consequência da administração crônica de CORT, quando se compara ao grupo controle (p<0,001). RIP II foi capaz de diminuir a concentração de nitrito nessa área cerebral (p<0,01),

assim como o fez o antidepressivo padrão ( $p < 0,001$ ).

Por fim, no hipocampo também houve aumento significativo da concentração de nitrito como consequência da administração de CORT ( $p < 0,01$ ). RIP II diminuiu significativamente essa concentração ( $p < 0,001$ ), de forma semelhante à FLU ( $p < 0,001$ ), como mostra o Gráfico 5C [ $F(3, 25) = 9,943$ ].

Gráfico 5 - Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a concentração de nitrito no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos



A: Córtex pré-frontal; B: Corpo estriado; C: Hipocampo. Cada coluna representa média  $\pm$  EPM ( $n=6-8$  animais/grupo). Valores significativos: ## $p < 0,01$  vs. CONTROLE; ### $p < 0,001$  vs. CONTROLE; \*\* $p < 0,01$  vs. CORT; \*\*\* $p < 0,001$  vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

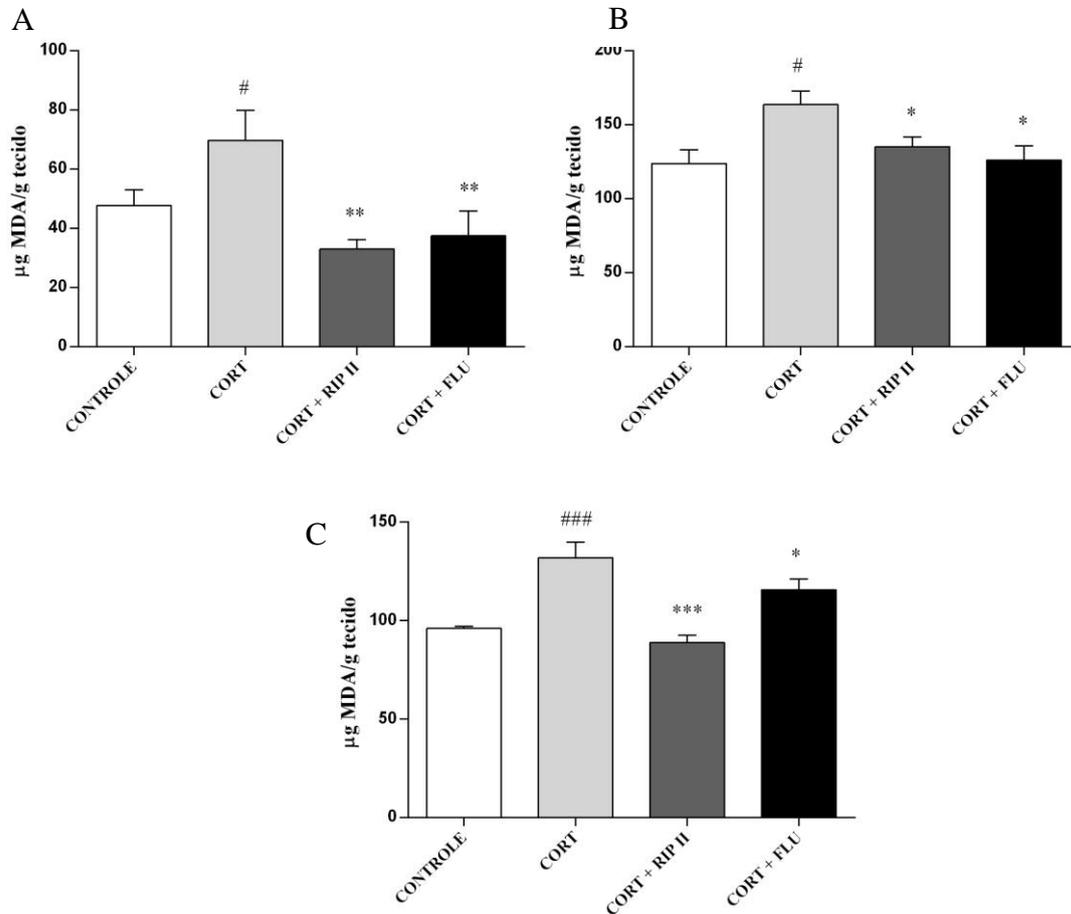
### *5.2.1.2 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a concentração de MDA no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos*

No córtex pré-frontal, observou-se diferença entre os grupos [ $F(3, 22) = 13,23$ ]. A concentração de MDA apresentou-se significativamente elevada nos animais tratados com CORT em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). No entanto, como mostra o Gráfico 6A, o tratamento com RIP II reverteu esse aumento ( $p < 0,01$ ) de maneira semelhante ao antidepressivo padrão FLU ( $p < 0,01$ ).

A concentração de MDA no corpo estriado dos camundongos tratados apenas com CORT também foi aumentada em comparação aos animais controle ( $p < 0,05$ ). Esse aumento foi revertido pelo tratamento com RIP II ( $p < 0,05$ ), de maneira semelhante ao antidepressivo padrão FLU ( $p < 0,05$ ), como pode ser visto no Gráfico 6B [ $F(3, 27) = 5,603$ ].

Por fim, houve diferença também no hipocampo [ $F(3, 23) = 4,153$ ]. O tratamento com CORT aumentou a concentração de MDA ( $p < 0,001$ ), porém o tratamento com RIP II foi capaz de reduzir essa concentração ( $p < 0,001$ ) de forma ainda mais significativa que FLU ( $p < 0,05$ ), como demonstrado do Gráfico 6C.

Gráfico 6 - Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a concentração de MDA no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos



A: Córtex pré-frontal; B: Corpo estriado; C: Hipocampo. Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (n=6-8 animais/grupo). Valores significativos: # $p < 0,05$  vs. CONTROLE; ## $p < 0,01$  vs. CONTROLE; ### $p < 0,001$  vs. CONTROLE; \* $p < 0,05$  vs. CORT; \*\* $p < 0,01$  vs. CORT; \*\*\* $p < 0,001$  vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

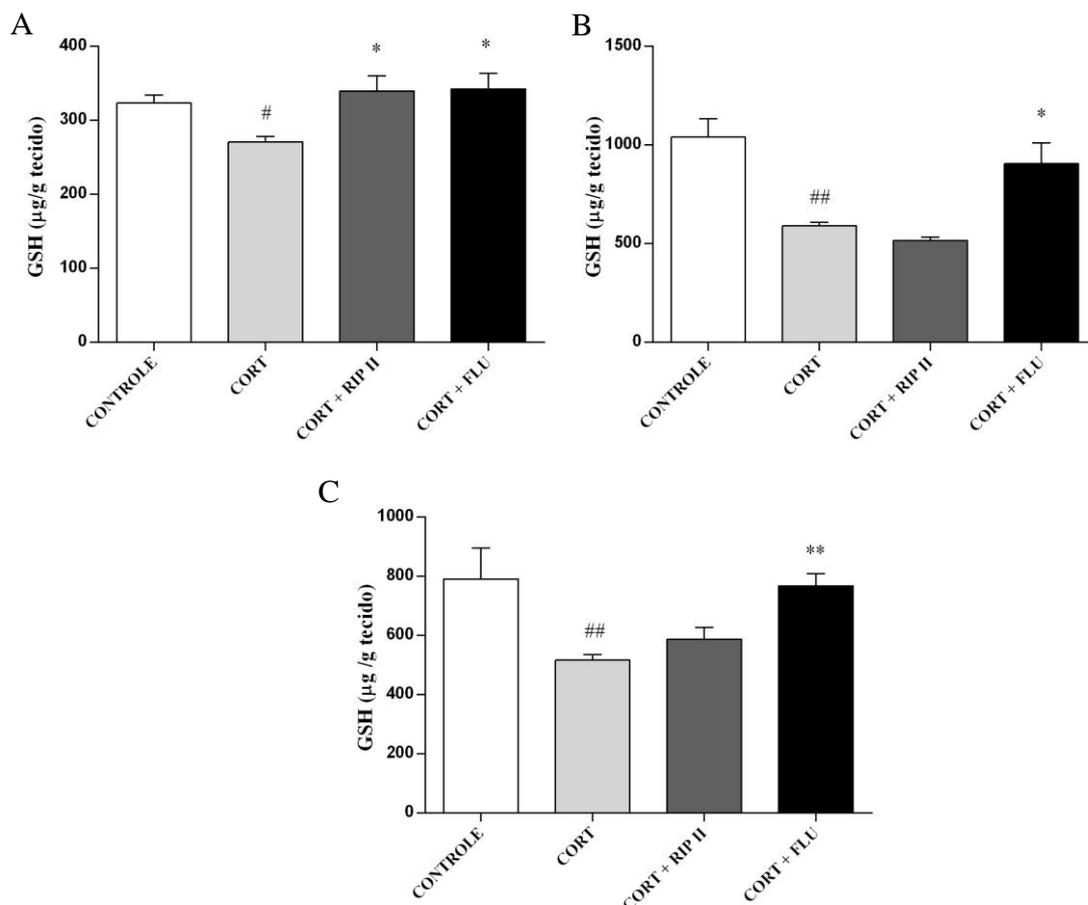
### 5.2.1.3 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a concentração de GSH no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos

A concentração de GSH foi significativamente diminuída no córtex pré-frontal dos camundongos que receberam apenas CORT, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O tratamento com RIP II ( $p < 0,05$ ), bem como com o antidepressivo FLU ( $p < 0,05$ ), foram capazes de aumentar significativamente essa concentração, como pode ser visto no Gráfico 7A [ $F(3, 21) = 3,997$ ].

No corpo estriado, também houve diferença significativa entre os grupos [F(3, 29) = 7,320]. O Gráfico 7B mostra a diminuição significativa da concentração de GSH como consequência da administração crônica de CORT, quando se compara ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). FLU aumentou a concentração de GSH ( $p < 0,05$ ), no entanto, RIP II não apresentou resultado estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

Por fim, no hipocampo também houve diminuição significativa da concentração de GSH como consequência da administração de CORT ( $p < 0,01$ ). FLU aumentou a concentração de GSH ( $p < 0,01$ ), no entanto, RIP II não apresentou resultado estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), como mostra o Gráfico 7C [F(3, 28) = 7,049].

Gráfico 7 – Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a concentração de GSH no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo de camundongos

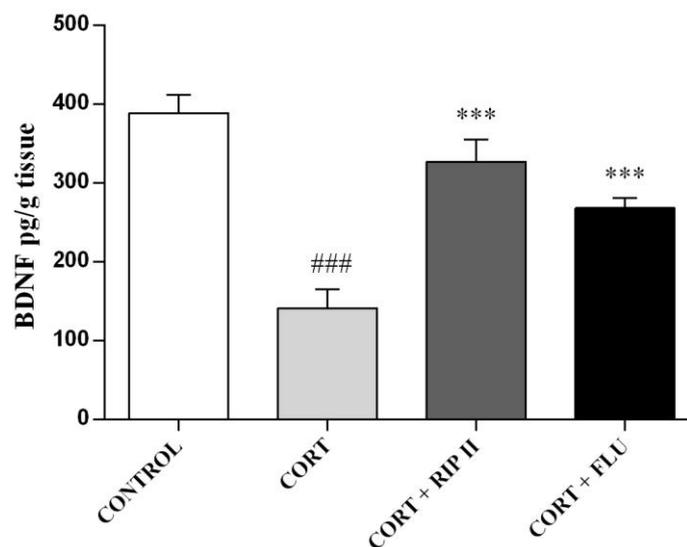


A: Córtes pré-frontal; B: Corpo estriado; C: Hipocampo. Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (n=6-8 animais/grupo). Valores significativos: # $p < 0,05$  vs. CONTROLE; ## $p < 0,01$  vs. CONTROLE; \* $p < 0,05$  vs. CORT; \*\* $p < 0,01$  vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

### 5.2.2 Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU sobre a concentração de BDNF no hipocampo de camundongos

Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos [F(3, 27) = 22,70]. Os animais submetidos à administração crônica de CORT apresentaram concentração de BDNF diminuída no hipocampo quando comparados aos animais controle ( $p < 0,001$ ). Essa concentração foi aumentada com a administração de RIP II ( $p < 0,001$ ), assim como do antidepressivo padrão ( $p < 0,001$ ) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Efeito da administração de CORT, RIP II e FLU no sobre a concentração de BDNF no hipocampo de camundongos



Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (n=8-10 animais/grupo). Valores significativos: ### $p < 0,001$  vs. CONTROLE; \*\*\* $p < 0,001$  vs. CORT, de acordo com ANOVA (*one-way*) seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Abreviações: RIP II = riparina II; FLU = fluvoxamina; CORT = corticosterona.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta os efeitos da RIP II sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em animais submetidos ao modelo de depressão induzida por CORT. Os aspectos aqui investigados visam uma correlação com os achados clínicos característicos da depressão, a fim de que seja possível obter dados científicos que permitam o desenvolvimento de novos tratamentos.

A depressão e o estresse são fenômenos inter-relacionados, de modo que este é hoje o principal fator ambiental descrito por diversos autores como responsável por precipitar transtorno depressivo (ANDREWS *et al.*, 2011; WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013). A exposição crônica a um fator estressor é capaz de desregular o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) que, em condições normais, na presença de um estresse agudo, seria ativado, mas seguidamente regulado por *feedback* negativo. No estresse crônico, no entanto, esse mecanismo de regulação está comprometido, causando um aumento dos níveis de glicocorticoides em regiões cerebrais principalmente relacionadas ao humor e ao aprendizado. Em humanos, o glicocorticoide elevado é o cortisol, enquanto nos camundongos encontra-se aumentada a corticosterona (ANTONI, 1986; MCEWEN, 2007; AGUILERA, 2011; ZUNSZAIN *et al.*, 2011; VINCENT *et al.*, 2013).

Diante disso, o Modelo de Exposição Crônica à Corticosterona tem sido descrito como eficaz para precipitar características semelhantes à depressão em animais, o que pode ser observado em testes comportamentais e neuroquímicos. Portanto, é um modelo útil como ferramenta no estudo da depressão (ZHAO, 2008a; SILVA *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Várias linhas de pesquisa indicam que os animais os quais passam por estresse crônico exibem, frequentemente, respostas diminuídas ou suprimidas do eixo HHA após reexposição ao mesmo estressor (ZHAO, 2008b). No presente trabalho, essa habituação foi comprovada no Teste do Nado Forçado de 14 dias, quando se observou o aumento no tempo de imobilidade dos animais que receberam corticosterona. O tempo de imobilidade esteve ainda mais aumentado quando o teste foi realizado após 21 dias, demonstrando que o Modelo de Exposição Crônica à Corticosterona foi capaz de induzir um estado depressivo nos animais, dependente do tempo, corroborando com os resultados de diversos autores. (ZHAO, 2008a; MURRAY *et al.*, 2008; IJIMA *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2011; MAO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013; SKÓRZEWSKA *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Para o rastreamento de drogas com potencial antidepressivo, os testes comportamentais

mais utilizados são o Nado Forçado e a Suspensão da Cauda (CRYAN; PAGE; LUCKI, 2002; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005), já que o aumento do comportamento passivo, como a imobilidade, e a diminuição do comportamento ativo, como o nado e a escalada, são indicativos de comportamentos depressivos (LUCKI *et al.*, 1997). Esses testes são considerados válidos porque as formas de tratamento que são eficazes em humanos, incluindo os antidepressivos típicos e atípicos, bem como a terapia por eletrochoque, são eficazes em diminuir o tempo de imobilidade (PORSOLT *et al.*, 1978; STERU *et al.*, 1985; GAWALI *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, foi possível verificar que o tratamento subcrônico com RIP II diminuiu significativamente o tempo de imobilidade nos testes de Nado Forçado (TNF) e Suspensão da Cauda (TSC), com atividade semelhante ao antidepressivo padrão FLU. Os dados obtidos reforçam a atividade antidepressiva da RIP II, já observada anteriormente por Teixeira *et al.* (2013), em modelo de estresse agudo. Iijima *et al.* (2010) concluiu em seus estudos que FLU não apresentou atividade antidepressiva no teste do nado forçado, quando administrada isoladamente de forma aguda, mas apenas quando em associação com risperidona. No entanto, nosso estudo mostrou que FLU, em administração subcrônica, foi capaz de reverter o efeito tipo depressivo causado por CORT no TNF.

Por meio do número de cruzamentos (*crossings*) no Teste do Campo Aberto (TCA), foi demonstrado que RIP II, FLU e CORT são drogas que não alteram a atividade locomotora dos animais. A realização do TCA foi de grande importância, visto que, através dessa análise, pode-se inferir a respeito da influência das drogas sobre o nível de excitabilidade do SNC. Segundo a literatura, a diminuição da atividade locomotora espontânea pode estar relacionada à sedação resultante da depressão do SNC, enquanto o aumento desse parâmetro pode estar associado a um efeito psicoestimulante (OZTURK *et al.*, 1996). O resultado obtido exclui a possibilidade de que, nos testes em que se utiliza como parâmetro o tempo de imobilidade, como os supracitados, os animais estejam respondendo devido a uma ação sedativa ou estimulante das drogas.

Um dos sintomas bastante frequentes na depressão é a anedonia, que diz respeito à perda de interesse ou prazer e que, quando associado a outros sintomas, como culpa e ideação suicida, é útil para se chegar ao diagnóstico de transtorno depressivo (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2012). A anedonia está associada a uma disfunção do sistema de recompensa cerebral, e ainda permanece como um dos sintomas difíceis de tratar (WILNER, 2005; DUNLOP; NEMEROFF, 2007). Um dos testes considerados úteis para a investigação de comportamento anedônico em modelos animais é o Teste de Preferência pela Solução de Sacarose, no qual a

diminuição da capacidade de resposta a recompensas é mostrada pela redução do consumo de uma solução açucarada (WILLNER, 2005; MAO *et al.*, 2014).

Como foi observado nesse experimento, a administração de CORT diminuiu a preferência dos animais pela solução de sacarose, fenômeno que já foi descrito anteriormente por diversos autores, mostrando que esse modelo de estresse é capaz de induzir a depressão, com características muito semelhantes às encontradas em humanos (GOURLEY *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2015; GONG *et al.*, 2016). No presente estudo, a administração de RIP II não foi capaz de causar reversão estatisticamente significativa.

Nesse teste também foi possível observar que FLU mostrou efeito anti-anedônico significativo. Em um trabalho recente, Hasebe *et al.* (2016) demonstrou que FLU apresentou efeito anti-anedonia em um modelo animal diferente, que consiste na diminuição da função do receptor GABA<sub>A</sub> por meio da administração de picrotoxina. O efeito anti-anedonia de FLU, bem como seu efeito antipsicótico, que a torna amplamente utilizada como monoterapia no tratamento Depressão Psicótica (GATTI *et al.*, 1996; ZANARDI *et al.*, 1996; ZANARDI *et al.*, 1998; FURUSE, HASHIMOTO, 2009; KISHIMOTO *et al.*, 2010), são comumente associados à sua alta afinidade pelo receptor  $\sigma_1$  (sigma-1), que tem um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças psiquiátricas (ISHIKAWA *et al.*, 2007; HASHIMOTO, 2009; KOURRICH *et al.*, 2012; HASEBE *et al.*, 2016). Esse achado sugere que FLU pode ser importante no tratamento de pacientes com depressão que apresentem comprometimento no comportamento prazeroso.

Além dos sintomas já relatados, a depressão apresenta alta comorbidade com transtornos de ansiedade e muitos autores já investigaram a atividade ansiolítica de antidepressivos (STRAUSS *et al.*, 1988; KAUFMAN, CHARNEY., 2000; MANES *et al.*, 2016; ADAMS *et al.*, 2016). Para avaliarmos essa associação, o teste do Labirinto em Cruz Elevado foi realizado. O LCE é o teste mais utilizado para a investigação do potencial ansiolítico de substâncias. Uma droga é considerada ansiolítica quando é capaz de aumentar a exploração nos braços abertos do aparato e o inverso é verdadeiro para que uma substância seja considerada ansiogênica (PELLOW *et al.* 1985).

Os resultados obtidos no LCE mostraram que a administração repetida de CORT desenvolveu um comportamento ansioso nos animais, porém o tratamento com RIP II foi capaz de reverter a ansiedade de forma semelhante ao antidepressivo FLU. Em estudo anterior de Sousa *et al.* (2007), com administração aguda, RIP II apresentou atividade ansiolítica no LCE apenas com uma dose maior (75 mg/kg). Além disso, por não alterar os parâmetros do Campo Aberto, RIP II mostrou ter atividade ansiolítica, sendo desprovida de efeito sedativo,

portanto, com menos efeitos indesejáveis que os benzodiazepínicos clássicos.

Além das alterações emocionais, estudos relatam o aparecimento de disfunções cognitivas em pacientes depressivos, sendo estas muito mais duradouras, podendo permanecer mesmo nos períodos de remissão (MILLAN *et al.*, 2012; MISKOWIAK *et al.*, 2012; MCINTYRE *et al.*, 2013). A exposição crônica ao estresse causa danos no aprendizado e memória. Esse fato se deve à desregulação do eixo HHA, levando a altas concentrações de cortisol, que se liga a seus receptores Glicocorticoides (GR) em áreas cerebrais. A principal área afetada é o hipocampo, visto que possui grande densidade de receptores GR (COLCIAGO *et al.*, 2015).

Para a avaliação da capacidade cognitiva dos animais, foi realizado o Labirinto em Y. Esse é um teste utilizado para a avaliação da memória operacional (*working memory*), que envolve várias áreas cerebrais, principalmente o córtex (OADES *et al.*, 1985). Além disso, também é considerado útil para avaliar a memória espacial, visto que o animal utiliza pontos do aparato para se localizar. Nesse tipo de memória, a principal área cerebral envolvida é o hipocampo (SQUIRE; ZOLA, 1996).

Quando colocados no aparato do Ymaze, usualmente os roedores visitam os três braços, um após o outro, pois têm a tendência de explorar ambientes novos (OADES *et al.*, 1985). No entanto, na exposição ao estresse crônico, pode-se observar diminuição do desempenho cognitivo por meio do Labirinto em Y, como já foi demonstrado em outros estudos (LUINE *et al.*, 1994; RADAHMADI *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015). O mesmo foi identificado no presente estudo. Os animais que receberam CORT apresentaram diminuição do número de alterações espontâneas, o que evidencia um comprometimento cognitivo em decorrência das altas concentrações de CORT. De maneira ainda mais significativa que o tratamento com FLU, a RIP II apresentou efeito benéfico, revertendo o déficit cognitivo nos animais. Esse efeito pode estar relacionado às atividades antioxidante e antiinflamatória apresentadas por RIP II em estudos anteriores do nosso grupo (CARVALHO *et al.*, 2013; TEIXEIRA, 2013; CARVALHO, 2016). Esse é um dado importante, visto que RIP II apresenta não apenas um efeito antidepressivo, mas também um efeito benéfico com relação a uma das comorbidades bastante frequentes em pacientes depressivos, que é o déficit cognitivo (ROGER *et al.*, 2013).

Atualmente, sabe-se que a depressão configura-se como um conjunto complexo de alterações que não podem ser discutidas unicamente em termos de diminuição nos níveis de monoaminas. Uma série de mecanismos tem sido relacionada à patogênese da depressão. O estresse oxidativo, bem como os fatores neurotróficos, sendo o BDNF o mais importante entre

eles, têm recebido atenção especial (NG *et al.*, 2008; KRISHNAN; NESTLER, 2008; CHUNG *et al.*, 2013). Por isso, fez-se relevante, além da avaliação comportamental, avaliar também, no presente estudo, as alterações neuroquímicas presentes nos animais expostos ao estresse crônico.

A grande vulnerabilidade do cérebro ao dano oxidativo, torna o estresse oxidativo um dos mecanismos importantes na patogênese da depressão (NG *et al.*, 2008). Estudos prévios relatam a relação existente entre altos níveis de GC em áreas cerebrais e o aumento de parâmetros do estresse oxidativo, acarretando o desenvolvimento de sintomatologia depressiva. Assim, a injeção repetida de CORT, como descrito em estudos anteriores, é capaz de aumentar os parâmetros de estresse oxidativo (ZAFIR; BANU, 2009a; ZAFIR; BANU, 2009b).

No presente estudo, a administração repetida de CORT elevou os níveis de MDA e nitrito no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo dos camundongos, demonstrando aumentada oxidação de estruturas lipídicas das células, com geração de EROs. Esses dados estão de acordo com os achados na literatura, que demonstram que o níveis elevados de GC estimulam o estresse oxidativo em áreas cerebrais, gerando EROs que estão potencialmente relacionadas à alteração no humor e no comportamento (STEIN-BEHRENS *et al.*, 1994). Portanto, a diminuição na função das áreas cerebrais, principalmente o hipocampo, em decorrência do dano oxidativo provocado pela exposição à CORT, pode ser positivamente correlacionado ao comportamento tipo depressivo observado nos camundongos por meio dos parâmetros comportamentais (GUPTA *et al.*, 2015).

No nosso estudo, RIP II, de forma semelhante à FLU, foi capaz de reduzir o dano oxidativo causado por CORT, como demonstrado na diminuição da concentração de nitrito e MDA no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo dos animais. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores, em que os antidepressivos são capazes de diminuir o dano oxidativo, sendo este, portanto, um possível mecanismo da atividade antidepressiva de RIP II (NG *et al.*, 2008; GUPTA *et al.*, 2015).

Além de mensurar a formação de produtos citotóxicos decorrentes da liberação de EROs, para determinar-se a ocorrência de desequilíbrio oxidativo, pode-se verificar a concentração de componentes antioxidantes. Dessa forma, foi determinada a concentração de GSH, a principal defesa antioxidante da célula, que é usada como substrato para que a enzima glutationa peroxidase converta o peróxido de hidrogênio (uma ERO) em água (KULAK *et al.*, 2013).

No nosso estudo, CORT promoveu a diminuição da defesa antioxidante, como

demonstrado pela redução da concentração de GSH no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo, corroborando com estudos anteriores (GUPTA *et al.*, 2015). Essa concentração encontra-se diminuída em decorrência da tentativa de eliminação das EROs geradas nas células neuronais. RIP II foi capaz de aumentar a concentração de GSH no córtex pré-frontal dos camundongos, porém não houve aumento significativo no corpo estriado e no hipocampo. Este fato pode ser devido à ação de RIP II sobre outros sistemas antioxidantes nessas áreas, como a catalase, uma enzima que pode, assim como a glutatona peroxidase, promover a detoxificação do peróxido de hidrogênio (GUPTA *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2015).

Além do estresse oxidativo, os fatores neurotróficos têm sido relacionados à patogênese da depressão, dentre eles, o BDNF tem recebido atenção especial. De acordo com a Hipótese Neurotrófica, a exposição ao estresse reduz a expressão de BDNF, principalmente em regiões límbicas, envolvidas na cognição e emoção, conseqüentemente diminuindo essas funções (DUMAN, MONTEGGIA, 2006). Estudos mostram que os antidepressivos são capazes de reverter esse quadro, aumentando os níveis de BDNF (SIUCIAK *et al.*, 1997; SOUSA *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015; GAWALI *et al.*, 2016).

De fato, o BDNF exerce seus efeitos, em parte, ao se ligar aos receptores TrkB, aumentando a fosforilação do CREB (*cAMP response element binding protein*) (LIU *et al.*, 2016), que está envolvido com os déficits emocionais induzidos pelo estresse (LI *et al.*, 2015). A sinalização de BDNF- TrkB exerce um papel importante na modulação de diversas funções, como a liberação de neurotransmissores e a resposta pós sináptica aos neurotransmissores, possuindo relação direta com a terapia antidepressiva (KOZISEK; MIDDLEMAS; BYLUND, 2008; YI *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2016).

O tratamento com antidepressivos, apesar de fornecer uma boa resposta, sabe-se que nem sempre é eficaz, e está relacionado a altos índices de resistência (AMSTERDAM, HORNIG-ROHAN, 1996; MCINTYRE *et al.*, 2014). Segundo alguns autores, a resistência ao tratamento com os antidepressivos pode estar relacionada a um polimorfismo no gene BDNF, que pode ser induzido pelo estresse (EGAN *et al.*, 2003; HOSANG *et al.*, 2014; EL-HAGE *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2017). Esse polimorfismo (Val66Met), que consiste na substituição do aminoácido valina por metionina no códon 66 do BDNF, mostrou alterar a expressão e o processamento de BDNF, bem como a sinalização BDNF-TrkB. Isso pode afetar a função do eixo HHA e os níveis de cortisol após exposição ao estresse (EGAN *et al.*, 2003; IBARGUEN-VARGAS *et al.*, 2009; SANCHEZ *et al.*, 2011; HOSANG *et al.*, 2014; EL-HAGE *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2017).

Essas alterações na expressão de BDNF são importantes principalmente a nível

hipocampal, visto que essa é uma área cerebral relacionada não apenas ao aprendizado e memória, como também ao prazer e recompensa (SHELIN, 2011; DESHMUKH, KNIERIM, 2012; BAI *et al.*, 2014).

No presente estudo, observou-se que a exposição repetida ao glicocorticóide causou uma diminuição da concentração de BDNF no hipocampo dos camundongos, corroborando com estudos anteriores, alguns dos quais realizados em nosso laboratório (SOUSA *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2015; SHEN, 2016; GONG *et al.*, 2016). O tratamento com RIP II, bem como o antidepressivo padrão, FLU, foi capaz de reverter esse dano de maneira significativa, elevando os níveis de BDNF. Esse dado sugere que a atividade antidepressiva de RIP II pode ser decorrente de estimulação à produção de fatores neurotróficos, indicando uma potencial atividade neuroprotetora.

É importante salientar que os dados aqui demonstrados com o modelo de estresse crônico corroboram com estudos anteriores, realizados por nosso grupo de pesquisa, que demonstraram atividade antidepressiva, ansiolítica, antiinflamatória e antioxidante da RIP II em modelos agudos de estresse (SOUSA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2013).

Portanto, a capacidade de RIP II de aumentar a concentração de BDNF no hipocampo representa um dado importante no esclarecimento de seu mecanismo para o tratamento da depressão, com ênfase na Hipótese Neurotrófica. Além disso, a alteração da expressão de BDNF é importante não apenas para o tratamento da depressão, mas está diretamente relacionado a diversas doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (CASTRÉN, RANTAMAKI, 2010; SHRIVASTAVA; DE SOUSA; RAO, 2016; MARSH, BLURTON-JONES, 2017), o que abre perspectivas para o estudo da RIP II em modelos de doenças como Parkinson e Alzheimer.

O presente trabalho dá seguimento ao estudo do potencial antidepressivo da RIP II em um modelo de estresse crônico induzido por CORT, antes apenas demonstrado em um modelo de estresse agudo, avançando, portanto, nos mecanismos envolvidos em sua atividade antidepressiva. Contudo, pesquisas subsequentes e mais detalhadas para identificar outros possíveis mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da RIP II ainda devem ser implementadas, até que se chegue ao seu uso terapêutico.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir as seguintes informações:

- O modelo de administração crônica de CORT em camundongos foi eficaz para induzir um estado depressivo;
- RIP II não apresentou efeito sedativo ou estimulante, não alterando a atividade locomotora de camundongos;
- O desamparo aprendido foi revertido por RIP II;
- RIP II apresentou tendência à reversão da anedonia provocada pela administração crônica de CORT em camundongos;
- Além da atividade antidepressiva, RIP II reverteu o comportamento ansioso em camundongos;
- Quanto ao benefício sobre a cognição, RIP II reverteu as alterações de memória induzidas por CORT em camundongos;
- Além disso, RIP II foi capaz de reduzir o dano oxidativo no córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo e aumentar a defesa antioxidante no córtex pré-frontal de camundongos expostos à CORT;
- RIP II aumentou a concentração de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos à administração crônica de CORT.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo é o primeiro a demonstrar o efeito antidepressivo da riparina II em modelo animal de depressão induzida por administração crônica de corticosterona. Esse efeito é acompanhado da capacidade de reverter sintomas associados à depressão, como ansiedade e déficit cognitivo. Esses efeitos sobre o comportamento provavelmente envolvem vias neurotróficas, já que o tratamento também foi eficaz em elevar os níveis de BDNF no hipocampo dos animais.

Os achados desse estudo são promissores, pois apresentam a atividade antidepressiva e antioxidante da riparina II em animais, que se mostrou desprovida do efeito sedativo presente na maioria dos fármacos em uso atualmente. Além disso, o envolvimento do fator neurotrófico aponta para uma capacidade de neuroproteção e neurogênese.

Embora os resultados aqui apresentados sejam de grande valor, outros estudos pré-clínicos precisam ser realizados para que riparina II seja uma alternativa terapêutica para o tratamento da depressão. Essa investigação deve incluir os mecanismos moleculares que estão envolvidos em sua atividade antidepressiva.

Desse modo, estudos posteriores com riparina II e possíveis associações são encorajados.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, G. C. et al. When social anxiety and depression go together: A population study of comorbidity and associated consequences. **Journal of Affective Disorders**, v. 206, p. 48–54, 2016.

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

AMATO, F. R. D.; RIZZI, R.; MOLES, A. A model of social stress in dominant mice Effects on sociosexual behaviour. v. 73, p. 421–426, 2001.

AMSTERDAM, J. D.; HORNIG-ROHAN, M. Treatment Algorithms in Tre Atment-Resistant. v. 19, n. 2, p. 371–386, 1996.

ANDREWS, P. W. et al. Blue again: Perturbational effects of antidepressants suggest monoaminergic homeostasis in major depression. **Frontiers in Psychology**, v. 2, n. JUL, p. 1–24, 2011.

American Psychiatric Association (APA), 2017. Depression. Disponível em: <<http://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>> acesso em: 30 mar 2017.

ANTONI, F. A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. **Endocrine Reviews**, v. 7, n. 4, p. 351–378, 1986.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. B.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tiramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**. v. 380, p. 337-344, 2009.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n.

2, p. 205–235, 1973.

BAI, M. Anhedonia was associated with the dysregulation of hippocampal HTR4 and microRNA Let-7a in rats. **Physiology and Behavior**, v. 129, p. 135–141, 2014.

BARBOSA FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A.M.; YONG, C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**. v. 26. p. 2615-2617, 1987.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.**, v.29, p.113-23, 2006.

BECKMAN, J.S., KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, p. 1424-37, 1996.

BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major Depression. **Major depression Primary care Diagnosis Management Pharmacotherapy**. v. 98, p. 981–1005, 2014.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BEST, J.; NIJHOUT, H. F.; REED, M. Serotonin synthesis , release and reuptake in terminals : a mathematical model. p. 1–26, 2010.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzymes activity and lipid peroxidation in major depression: alteration by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, p. 43-51, 2001.

CALDARONE, B. J.; ZACHARIOU, V.; KING, S. L. Rodent models of treatment-resistant depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 51–65, 2015.

CARLSON, E. E. Natural Products as Chemical Probes. **ACS Chem Biol.**, v. 5, n. 7, p. 639–653, 2010.

CARVALHO, A. M. R. et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, n. 3, p. 165–172, 2013.

CARVALHO, A. M. R. **Estudo do mecanismo de ação da atividade nociceptiva da riparina II de Aniba riparia em camundongos**. 2016. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2016.

CASTELO-BRANCO, U. V. **Preparação e estudos farmacológicos do éter metílico de N-benzoiltiramina e do éter metílico de N-(2-hidroxibenzoil)-tiramina**. 1992. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 1992.

CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V. Preliminary Pharmacological Studies on three Benzoyl Amides , constituents of Aniba riparia ( Nees ) Mez ( Lauraceae ). v. 19, n. 3, p. 197–202, 2000.

CASTRÉN, E.; RANTAMÄKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. **Developmental Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 289–297, 2010.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 15, n. 4, p. 379–400, 23 abr. 2011.

CHUNG, C. P.; SCHMIDT, D.; STEIN, C. M.; MORROW, J. D.; SALOMON, R. M. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. **Psychiatric Research**, v. 206, p. 213 - 216.

COLCIAGO, A. et al. Learning and memory: Steroids and epigenetics. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, p. 64–85, 2015.

CONRAD, C. D. et al. Chronic Stress Impairs Rat Spatial Memory on the Y Maze , and This Effect Is Blocked by Tianeptine Pretreatment. v. 110, n. 6, p. 1321–1334, 1996.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **E-European Journal of Pharmacology**, 436, p.197-205, 2002.

CRYAN, J. F. et al. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. 2004.

CRYAN J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, 2005, p.547- 569, 2005.

CUIJPERS, P. et al. Psychotherapy for Depression in Adults: A Meta-Analysis of Comparative Outcome Studies. v. 76, n. 6, p. 909–922, 2008.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory? v. 3, n. February, p. 1–14, 2010.

DALRYMPLE, K. L.; ZIMMERMAN, M. Does comorbid Social Anxiety Disorder impact the clinical presentation of principal Major Depressive Disorder? v.100, p.24-247, 2007.

DAWSON, T.M., SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci**, v. 14, p. 5147–5159, 1994.

DEL PORTO, J. A.; MELLO, A. F.; KERR-CORREA, F.; SANTOS JUNIOR, A. S.; MOENO, R. A.; SANTOS, C. H. R.; CHAVES, A. V.; VERSIANI, M.; NARDI, A. E.; OLIVEIRA, I. R.; RIBEIRO, M. G.; KAPCZINSKI, F.; GAZALLE, F.; FREY, B.; TAMAI, S. Fluvoxamina no transtorno depressivo maior: um estudo multicêntrico aberto. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 56, n. 1, p. 17-22, 2007.

DESHMUKH, S. S.; KNIERIM, J. J. Hippocampus. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 3, n. 2, p. 231–251, 2012.

DEUSSING, J. M. Disorders of the central nervous system Animal models of depression. v. 3, n. 4, p. 375–383, 2006.

DEVASAGAYAM, T. P.; BOLOOR, K. K.; RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. **Indian J Biochem Biophys.**, v. 40, n. 5, p. 300-308, 2003.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, v. 568, n. 1, p. 177-185, 2007.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.

DUNLOP BW; NEMEROFF CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 3, p. 327–337, 2007.

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

EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, v. 112, p. 257–269, 2003.

EL-HAGE, W. et al. The BDNF Val66Met polymorphism is associated with escitalopram response in depressed patients. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 3, p. 575–81, 2014.

ERKKILÄ, J. et al. Individual music therapy for depression: randomised controlled trial. **The British Journal of Psychiatry**, v. 199, n. 2, 2011.

FERRARI, A. J. et al. The Epidemiological Modelling of Major Depressive Disorder: Application for the Global Burden of Disease Study 2010. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

FRIED, E. I.; NESSE, R. M. Depression is not a consistent syndrome: An investigation of unique symptom patterns in the STAR\*D study. **Journal of Affective Disorders**, v. 172, p. 96–102, 2015.

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

FURUSE, T.; HASHIMOTO, K. Fluvoxamine monotherapy for psychotic depression: the potential role of sigma-1 receptors. **Annals of general psychiatry**, v. 8, p. 26, 2009.

GATTI, F.; BELLINI, L.; GASPERINI, M. Fluvoxamine alone in the treatment of delusional depression. **Am J Psychiatry**, p. 414-416, 1996

GAWALI, N. B. et al. Agmatine ameliorates lipopolysaccharide induced depressive-like behaviour in mice by targeting the underlying inflammatory and oxido-nitrosative mediators. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 149, p. 1–8, 2016.

GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression : high vs low CRH / NE states. p. 254–275, 2002.

GONG, M. JUAN et al. Icariin reverses corticosterone-induced depression-like behavior, decrease in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and metabolic network disturbances revealed by NMR-based metabonomics in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 123, p. 63–73, 2016.

GOURLEY, S. L.; WU, F. J.; TAYLOR, J. R. Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 509–514, 2008.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Effect of a novel 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist 4i, in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. **Steroids**, v. 96, p. 95-102, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HASEBE, S. et al. Anti-anhedonic effect of selective serotonin reuptake inhibitors with

affinity for  $\sigma_1$  receptors in picrotoxin-treated mice. **British Journal of Pharmacology**, 2016.

HASHIMOTO, K. Sigma-1 Receptors and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Clinical Implications of their Relationship. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* v. 9, 197–204, 2009.

HEISLER, L. K. et al. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 15049–54, 8 dez. 1998.

HESDORFFER, D. C. et al. Depression and suicide attempt as risk factors for incident unprovoked seizures. **Annals of Neurology**, v. 59, n. 1, p. 35–41, jan. 2006.

HIDAKA, B. H. Depression as a disease of modernity: Explanations for increasing prevalence. **Journal of Affective Disorders**, v. 140, n. 3, p. 205–214, 2012.

HOLSBOER, F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *q.* v. 62, p. 77–91, 2001.

HOSANG, G. M. et al. Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. **BMC medicine**, v. 12, p. 7, 2014.

HUANG, Z. et al. Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neuroscience Letters**, v. 493, n. 3, p. 145–148, 2011.

IBARGUEN-VARGAS, Y. et al. Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 2, p. 245–251, 14 set. 2009.

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

INOUE T., KOYAMA T. Effects of acute and chronic administration of high dose corticosterone and dexamethasone on regional brain dopamine and serotonin metabolism in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, p. 147-156, 1996.

ISHIKAWA, M. et al. High Occupancy of Sigma-1 Receptors in the Human Brain after Single Oral Administration of Fluvoxamine: A Positron Emission Tomography Study Using [11C]SA4503. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 8, p. 878–883, 2007.

JIANG, R. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism interacts with gender to influence cortisol responses to mental stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 79, p. 13–19, 2017.

JUNG, K. H. et al. Blockade of AT1 receptor reduces apoptosis, inflammation, and oxidative stress in normotensive rats with intracerebral hemorrhage. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 322, n. 3, p. 1051-1058, 2007.

KAMIOKA, H. et al. Effectiveness of music therapy: a summary of systematic reviews based on randomized controlled trials of music interventions. **Patient Preference and Adherence**, v. 8, p. 727, maio 2014.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. S.; HUDSPETH, A. J. **Princípios de neurociências**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1496p.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Pathophysiology of mood disorders in temporal lobe epilepsy. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. SUPPL2, p. 233–259, 2012.

KAUFMAN, J.; CHARNEY, D. Comorbidity of mood and anxiety disorders. **Depression**, v. 12 Suppl 1, n. 1, p. 69–76, 2000.

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

KESSLER, R. Epidemiology of women and depression. **Journal of Affective Disorders** v.74, p. 5-13, 2003

KISHIMOTO, A., TODANI, A., MIURA, J., KITAGAKI, T., HASHIMOTO, K. The opposite

effects of fluvoxamine and sertraline in the treatment of psychotic major depression: a case report. **Ann. Gen. Psychiatry** 9, 23, 2010.

KNOL, M. J. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. **Diabetologia**, v. 49, n. 5, p. 837–845, 2006.

KOOY, K. VAN DER et al. Depression and the risk for cardiovascular diseases : systematic review and meta analysis., p. 613–626, 2007.

KORNSTEIN, S.; SCHNEIDER, R. Clinical features of treatment-resistant depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 18–25, 2001.

KOURRICH, S. et al. The sigma-1 receptor: Roles in neuronal plasticity and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 12, p. 762–771, 2012.

KOZISEK, M. E.; MIDDLEMAS, D.; BYLUND, D. B. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 117, n. 1, p. 30–51, 2008.

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

KULAK, A. et al. Redox dysregulation in the pathophysiology of schizophrenia and bipolar disorder: insights from animal models. **Antioxid Redox Signal.**, v. 18, n. 12, p. 1428-1443, 2013.

LAWS, D.; ASHFORD, J. J.; ANSTEE, J. A. A multicentre double-blind comparative trial of fluvoxamine versus lorazepam in mixed anxiety and depression treated in general practice. **Acta Psychiatr Scand.**v.81, n.2.p.185-189, 1990.

LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; FONSECA, F. N.; PEREIRA, F. A.; VASCONCELOS, S. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Efeito de N-(hidroxibenzoil)-tiramina (riparina II) de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) nos modelos comportamentais de convulsão induzida por pentilenotetrazol e

estricina em camundongos. In: XXI Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2006, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindoia, 2006.

LEVENTHAL, C. et al. Endothelial Trophic Support of Neuronal Production and Recruitment from the Adult Mammalian Subependyma. v. 464, p. 450–464, 1999.

LI, J. et al. Neuropeptide trefoil factor 3 reverses depressive-like behaviors by activation of BDNF-ERK-CREB signaling in olfactory bulbectomized rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28386–28400, 2015.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.

LIU, W. X. Regulation of glutamate transporter 1 via BDNF-TrkB signaling plays a role in the anti-apoptotic and antidepressant effects of ketamine in chronic unpredictable stress model of depression. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 3, p. 405–415, 2016.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav Pharmacol.** p 523-532, 1997

LUINE, V. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. **Brain Research**, v. 639, n. 1, p. 167–170, 1994.

MAGALHÃES, P. V. et al. N-acetyl cysteine add-on treatment for bipolar II disorder: a subgroup analysis of a randomized placebo-controlled trial. **J. Affect. Disord.**, v. 129, n. 1–3, p. 317–320, 2011.

MAES, M. et al. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. **Neuro Endocrinol Lett.**, v.32, n.1, p. 7-24, 2011a.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.**, v. 35, n.3, p. 676-692, 2011b.

MANES, S. Social anxiety as a potential mediator of the association between attachment and depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 205, p. 264–268, 2016.

MAO, Q. Q. Peony glycosides reverse the effects of corticosterone on behavior and brain BDNF expression in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 1, p. 305–309, 2012.

MAO, Q. Q. Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. **Neurochemistry International**, v. 74, p. 36–41, 2014.

MARQUES, A. D. S.; ZHENG, C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIN, C. T.; GUTIERREZ, S. J. C.; Electronic and structural effects in muscular relaxants : Riparin I and Riparin III. **Journal of Molecular Structure**. v. 753, p. 13-21, 2005.

MARQUES, A. D. S. Importância econômica da família lauraceae lindl. **Floresta e ambiente**, v. 8, p. 195-206, 2001.

MARSH, S. E.; BLURTON-JONES, M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. **Neurochemistry International**, p. 1–7, 2017.

MAYORGA, A. J. et al. Antidepressant-Like Behavioral Effects in. v. 298, n. 3, p. 1101–1107, 2001.

MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 3, p. 171-179, 1998.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 873–904, 2007.

MCINTYRE, R. S. et al. Cognitive deficits and functional outcomes in major depressive disorder: Determinants, substrates, and treatment interventions. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 6, p. 515–527, 2013.

MCINTYRE, R. S. et al. Treatment-resistant depression: Definitions, review of the evidence,

and algorithmic approach. **Journal of Affective Disorders**, v. 156, p. 1–7, 2014.

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

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-(dihydroxybenzoyl) tiramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006.

MILLAN, M. J. *et al.* Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 2, p. 141–168, 2012.

MISKOWIAK, K. W. *et al.* Erythropoietin: A candidate treatment for mood symptoms and memory dysfunction in depression. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 3, p. 687–698, 2012.

MONTEIRO, A. P.; MELO, C. T. V.; LEITE, C. P.; FILHO, F. E. R.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, F. C. F. Anticonvulsant properties of riparin I (rip I) and riparin III (rip III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **r**, v. 41, p. 241, 2005.

MORENO, R. A.; MARCIA BRITO, D. H.; DE MACEDO SOARES, M. B. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, n. SUPPL. 1, p. 24–40, 1999.

MUNDO, E.; ROUILLON, F.; FIGUERA, M. L.; STIGLER, M. Fluvoxamine in obsessive-compulsive disorder: similar efficacy but superior tolerability in comparison with clomipramine. **Human Psychopharmacology**, v.16, p. 461-468, 2001.

MURRAY, F.; SMITH, D. W.; HUTSON, P. H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like

behaviours in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 1, p. 115–127, 2008.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of Depression Review. v. 34, p. 13–25, 2002.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.11, n. 6, p. 851 - 876, 2008.

NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Research, National Research, National Academies Press Council., 1996.

NUMAKAWA, T. et al. BDNF function and intracellular signaling in neurons Histology and p. 237–258, 2010.

NUNES, G. B.; COSTA, L. M.; GUTIERREZ, S. J.; SATYAL, P.; FREITAS, R. M. 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, 2015.

OCZAN, E. M.; MUKADDES, G.; ELIF, O.; RUHCAN, P.; OMER, A. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 89-95, 2004.

O'LEARY, O. F.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Faster, better, stronger: Towards new antidepressant therapeutic strategies. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 32–50, 2015.

OADES, R. et al. Dopamine-sensitive alternation and collateral behaviour in a Y-maze: Effects of d-amphetamine and haloperidol. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 1, p. 123–128, 1985.

OTTEVANGER, E. A. The efficacy of flvoxamine in patients with. n. 1989, p. 731–740, 1994.

OWNBY, R. L. et al. Depression and Risk for Alzheimer Disease. **Archives of General**

**Psychiatry**, v. 63, n. 5, p. 530, 1 maio 2006.

OZTURK, Y.; AYDINI, S., BEIS, R.; BASER, K.H.C.; BERBEROGLU, H. Effect of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calximun* L. extract on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, p. 139-146, 1996.

PALLAVI, P. et al. Serum neurotrophic factors in adolescent depression : Gender difference and correlation with clinical severity. **Journal of Affective Disorders**, v. 150, n. 2, p. 415–423, 2013.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245–255, 2005.

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

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N. *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol**, v.47, 1978, p. 379-391.

RADAHMADI, M. et al. Effects of different timing of stress on corticosterone, BDNF and memory in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 139, p. 459–467, 2015.

RADENOVIC, L. et al. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comp. Biochem. Physiol.C Toxicol. Pharmacol.**, v.135, v. 4, p. 443-450, 2003.

REGIONAL, O. N.; DOPAMINE, B. Takjzshi inoue and tsukasa koyama. 1996.

SANCHEZ, M. M. et al. BDNF polymorphism predicts the rate of decline in skilled task performance and hippocampal volume in healthy individuals. **Translational Psychiatry**, v. 1, n. 10, p. e51, 25 out. 2011.

SAPOLSKY, R. M. **Why zebras don't get ulcers.** [s.l: s.n.]. v. 79

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced

impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 4, p. 491–495, 1988.

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

SEIXAS, S. R. S. Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora. 1996. 103f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 1996.

SHELINE, Y. I. Depression and the hippocampus: Cause or effect? **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 308–309, 2011.

SHEN, J. D. et al. Berberine up-regulates the BDNF expression in hippocampus and attenuates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience Letters**, v. 614, p. 77–82, 2016.

SHRIVASTAVA, A.; DE SOUSA, A.; RAO, G. P. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Suicide in Schizophrenia: Critical Role of Neuroprotective Mechanisms as an Emerging Hypothesis. **Indian journal of psychological medicine**, v. 38, n. 6, p. 499–504, 2016.

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

SILVEIRA, A. L. **Toxicidade pré-clínica dos análogos das riparinas I, II e III utilizando modelos *in vitro***. 2007. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2007.

SIUCIAK, J. A. et al. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 56, n. 1, p. 131–7, 1997.

SKÓRZEWSKA, A. et al. The effect of chronic administration of corticosterone on anxiety- and depression-like behavior and the expression of GABA-A receptor alpha-2 subunits in

brain structures of low- and high-anxiety rats. **Hormones and Behavior**, v. 65, n. 1, p. 6–13, 2014.

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

SOUSA, C. N. S. DE et al. Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. **Psychiatry Research**, v. 230, n. 2, p. 211–219, 2015.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; METO, C. T. V.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M; FONTELES, M. M. F; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of Riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 22-33, 2004.

SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; METO, C. T. V.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M; FONTELES, M. M. F; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Antianxiety effects of Riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 12, p. 1005-1008, 2005.

SOUSA, F. C. F. DE et al. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 7, p. 1212–1216, 2007.

SOUTHWICK, S. M.; CHARNEY, D. S. The psychobiology of depression and resilience to stress : Implications for CONTENTS. 2005.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13515–13522, 1996.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: Bases neurocientíficas e aplicações práticas**. 4ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2014. 713p.

STEIN-BEHRENS, B. A.; LIN, W. J.; SAPOLSKY, R. M. Physiological elevations of glucocorticoides potentiate glutamate accumulation in the hippocampus, **Journal of Neurochemistry**, v. 63, n. 2, p. 596-602, 1994.

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

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressant in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. September, p. 367, 1985.

STRAUSS, C. C. et al. Association between anxiety and depression in children and adolescents with anxiety disorders. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 16, n. 1, p. 57–68, 1988.

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

TEIXEIRA, C. P. L. **Efeito antidepressivo da riparina II: investigação do mecanismo de ação através das alterações comportamentais, neuroquímicas e do estresse oxidativo**. 2013. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2013.

THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, J. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BACHELET, M.; VARGAFITIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-2(hidroxi-benzoyl) tiramine a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 103-107, 1994.

UZÜM, G. et al. Nitric oxide involvement in seizures elicited by pentylentetrazol and sex

dependence. **Int. J. Neurosci.**, v.115, n. 11, p. 153-1514, 2005.

VASCONCELOS, A. 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, 2015.

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

WANG, D.; AN, S. C.; ZHANG, X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neuroscience letters.*, v. 433, n. 1, p. 59-64, 2008.

WILLNER, P. *Psychopharmacology The validity of animal models of depression.* p. 1–16, 1984.

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

WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2331–2371, 2013.

World Health Organization (WHO), 2017. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>> Acesso em: 05 mar. 2017.

YAN, T. et al. Schisandra chinensis produces the antidepressant-like effects in repeated corticosterone-induced mice via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway. **Psychiatry Research**, v. 243, p. 135–142, 2016.

YI, L. T. et al. BDNF signaling is necessary for the antidepressant-like effect of naringenin. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 135–141, 2014.

ZAFIR, A.; BANU, N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, p. 167-177, 2009a.

ZAFIR, A.; BANU, N. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, v.46, p. 53-58, 2009b.

ZANARDI, R.; PEREZ, J.; SMERALDI, E. Fluvoxamine alone in the treatment of delusional depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 6, p. 126, 1996.

ZANARDI, R.; FRANCHINI, L.; GASPERINI, M. Selective serotonin reuptake inhibitors alone and in association with pindolol in the treatment of delusional depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 8, p. 598-599, 1998.

ZHAO, Y. et al. Chronic corticosterone injections induce a decrease of ATP levels and sustained activation of AMP-activated protein kinase in hippocampal tissues of male mice. **Brain Research**, v. 1191, p. 148–156, 2008a.

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

ZUARDI, 2013. Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. Disponível em: <<http://www.isaudebahia.com.br/noticias/detalhe/noticia/pe-quente-cabeca-fria-cuidado-com-o-estresse/>> Acesso em: 02 mai. 2017.

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

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA CEUA



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 CEP: 60430-970 Fortaleza-CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA II EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO MODELO DE ENTRESSE CRÔNICO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA", protocolo nº103/2015, sob responsabilidade da Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 09 de dezembro de 2015.

Vigência do projeto	01/08/2015 a 31/07/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss
Nº de Animais	194
Peso/Idade	21-25g / 4-8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 10 de dezembro de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sinepe 1526134