



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**NATÁLIA FERREIRA DE OLIVEIRA**

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DA RIPARINA IV:  
ENVOLVIMENTO MONOAMINÉRGICO, GABAÉRGICO E  
NEUROINFLAMATÓRIO**

**FORTALEZA**

**2019**

NATÁLIA FERREIRA DE OLIVEIRA

EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DA RIPARINA IV: ENVOLVIMENTO  
MONOAMINÉRGICO, GABAÉRGICO E NEUROINFLAMATÓRIO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) a fim de apreciação pela banca como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de concentração saúde.  
Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Coorientadora: Alyne Mara Rodrigues de Carvalho

FORTALEZA

2019

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)

---

- O48e Oliveira, Natália Ferreira de.  
Efeito antidepressivo e ansiolítico da riparina IV: envolvimento monoaminérgico, GABAérgico e neuroinflamatório / Natália Ferreira de Oliveira. – 2019.  
105 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.  
Coorientação: Profa. Dra. Alyne Mara Rodrigues de Carvalho.
1. Depressão. 2. Monoaminas Biogênicas. 3. Estresse Oxidativo. 4. Neuroinflamação. 5. Riparina. I.  
Título.

CDD 660.6

---

NATÁLIA FERREIRA DE OLIVEIRA

EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DA RIPARINA IV: ENVOLVIMENTO  
MONOAMINÉRGICO, GABAÉRGICO E NEUROINFLAMATÓRIO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) afim de apreciação pela banca como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de concentração saúde.

Aprovada em: 07/06/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Alyne Mara Rodrigues de Carvalho (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Kelly Rose Tavares Neves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior  
Centro Universitário Christus

---

Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

## AGRADECIMENTOS

Essa conquista é fruto de muita dedicação, não apenas pessoal, mas de uma força coletiva.

Primeiro agradeço a Deus, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida dando-me sabedoria e inteligência para traçar o melhor caminho, por sempre me oferecer o que preciso para ser feliz, independente da minha vontade. Toda honra e toda glória a ti Senhor.

A minha filha Júlia, pessoa mais importante da minha vida. Criança linda, inteligente e compreensiva. Sempre entendeu que a mamãe tinha que estudar e, muitas vezes, também ficava estudando para dizer que estava imitando a mamãe. Minha alegria diária!

Ao meu maravilhoso esposo Danúsio, por me ajudar em todos os detalhes na construção dos meus sonhos, que ele sempre fala que são nossos. Ele é meu porto seguro, meu psicólogo, meu melhor amigo, meu cozinheiro, meu estatístico, meu “*google*” e, sem dúvidas, meu amor. Sempre falo que se todas as minhas conquistas eu pudesse dividir ao meio, metade seria dele, inquestionavelmente, incluído este título.

Ao meu Pai, José, hoje presente apenas em meu coração e em meus pensamentos, e a minha mãe, Fátima, por sempre terem me ensinado o caminho do amor, da honestidade, da caridade, da responsabilidade e do conhecimento. Por sempre terem se esforçado, ao máximo, não para me darem tudo que eu queria, mas tudo que precisei e que eles podiam. Meu eterno agradecimento.

Ao meu irmão Natanael e aos demais familiares, por sempre vibrarem juntos em cada conquista e sempre demonstrarem orgulho em tudo que faço. Agradeço, em especial, a tia Neném, que desde o nascimento cuida de mim e ainda me deu a Ua de presente, pessoa de coração bondoso, que sempre incentivou a buscar o conhecimento e foi meu apoio desde o início da minha vida acadêmica.

Aos meus sogros, Fátima e Ricardo, por terem educado tão bem o Danúsio e serem um apoio, principalmente, com a Julinha.

A todas as amizades construídas ao longo da vida, em especial a Luciana, minha amiga do colégio, por está presente em todos os momentos especiais; as amigas cobras, Bela, Vivian, Auri, Quell, Priscila e Milena, por serem motivos de felicidade, por vibrarem a cada conquista, por chorarem junto comigo, por me darem força, por me ensinarem a ser uma pessoa melhor, presente superior a este a UFC não conseguiria me dar, amo o jeito de cada uma; a

Fatinha, pessoa colocada por Deus em minha vida, sempre me escutando e orientando, principalmente nos momentos mais difíceis.

A minha amada orientadora, Professora Cléa, “mãe científica”, como todos os seus alunos justamente a chamam. Exemplo de educadora, de pessoa, de mãe, de amiga, de profissional a ser seguido. Pessoa de coração enorme e astral maior ainda. É difícil descrever suas inúmeras qualidades em poucas palavras. À senhora, só gratidão e admiração. Deus não poderia ter me dado orientadora melhor.

A todos os amigos de laboratório, em especial, a Auriana, por ter me levado até a professora Cléa e por inúmeras coisas boas que você representa na minha vida; a Íris, que pegou na minha mão desde o início desta caminhada e com muita paciência foi me ensinando tudo, inclusive manusear os camundongos; a Raquell, por dividir todas as angústias, alegrias e experimentos com a Riparina IV; ao Daniel e ao Thiago, que foram bolsistas de iniciação científica e hoje são mestrandos maravilhosos, sempre estavam disponíveis para me ajudar, aos dois me faltam palavras para agradecer; a minha cunhada e hoje mestranda, Manoela, que desde quando entrou no laboratório, participou de todos os meus experimentos, mesmo tendo seus *blacks* trabalhosos para dar conta; a Alyne Mara, por sua disponibilidade e valiosas contribuições para o enriquecimento deste trabalho; ao Vitor, Adriano, Dilailson, Mariana, Iardja, Leo, Kelly, Carlos Gadelha, Gabriel, Layla, Lorena, Vila, Lena e todos os demais bolsistas/integrantes do laboratório de neurofarmacologia, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Este grupo é uma verdadeira família, acolhimento melhor eu não poderia ter tido.

A todos os professores e orientadores que tive durante a vida acadêmica, em especial a Eudiana, a primeira pessoa que me deu uma bolsa na graduação, a professora Nirla, a professora Aparecida, aos farmacêuticos Eugenie Neri, Hannah Iorio, José Alcântara Neto, Francisca Damasceno e Fátima Menezes, a equipe da gerência de risco, Priscila, Adriano e Auriana – todos contribuíram enormemente com meu currículo para a seleção do doutorado e, mais ainda, para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Márcio Cavalcante, um gestor maravilhoso por sempre ter me ajudado para que eu conseguisse conciliar tudo, da melhor forma possível.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Paraíba, por sintetizar e ceder a Riparina IV utilizada no desenvolvimento desta pesquisa.

A coordenação RENORBIO-UFC, especialmente ao professor Ivanildo, sempre disponível para auxiliar os alunos, e ao secretário Adil, que sempre atendeu a todas as minhas solicitações com presteza e dedicação.

Ao professor Odorico, por todo trabalho desempenhando na construção do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). A estrutura oferecida foi fundamental para a qualidade e validade dos resultados desta pesquisa.

Aos veterinários Wesley e Gabriela, por todo cuidado e dedicação aos animais utilizados nesta pesquisa e por todas as orientações fornecidas para que eu pudesse trabalhar com os camundongos da forma mais humana possível.

A banca de qualificação e defesa, pela disponibilidade em contribuir na melhoria deste trabalho. Tenho enorme admiração pelo trabalho de vocês e tenho certeza de como este trabalho ficará engrandecido com as sugestões dadas.

As instituições de fomento, FUNCAP, CAPES e CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

Aos camundongos, por cederem suas vidas em prol da pesquisa e do bem-estar.



“Espera no Senhor, anima-te, e ele fortalecerá  
teu coração; espera, pois, no Senhor”.

(Salmos 27:14)

## RESUMO

A depressão e a ansiedade, atualmente, são os transtornos psiquiátricos mais frequentes na sociedade. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que a depressão é uma das principais causas de incapacidade no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública, gerando impactos negativos para a sociedade e para os sistemas públicos. Globalmente, estima-se que 4,4% da população mundial sofre de transtorno depressivo e 3,6% de transtorno de ansiedade. As hipóteses disponíveis sobre a fisiopatologia da depressão são baseadas em estudos que investigam o estresse psicossocial e seus hormônios, neurotransmissores, neurocircuitos, fatores neurotróficos, ritmo circadiano e envolvimento do sistema imune. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antidepressivo e ansiolítico do tratamento agudo com Riparina IV em modelos comportamentais e neuroquímicos, em camundongos. Para isso, foram realizados testes comportamentais, como o do nado forçado e suspensão da cauda, na avaliação do efeito antidepressivo, labirinto em cruz elavada e placa perfurada, na investigação da atividade ansiolítica, campo aberto e barra giratória, para avaliar a atividade locomotora espontânea e coordenação motora; testes neuroquímicos, como a dosagem de monoaminas e seus metabólitos, de citocinas e o estresse oxidativo no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado; e predição computacional da farmacocinética, afinidade e modo de ligação da Riparina IV a alvos da neurotransmissão monoaminérgica e GABAérgica. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em animais da Universidade Federal do Ceará. Os resultados mostraram que a Riparina IV apresentou, em testes comportamentais, ação antidepressiva e ansiolítica, sem modificar a atividade locomotora e a coordenação motora. A substância aumentou os níveis de monoaminas e seus metabólitos no hipocampo, córtex pré-frontal e no corpo estriado de camundongos. Além disso, foi verificado o envolvimento dos sistemas noradrenérgico ( $\alpha_2$ ), dopaminérgico (D1 e D2), serotoninérgico (5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub>) e GABAérgico no mecanismo de ação da Riparina IV e um efeito neuroprotetor, principalmente na região hipocampal, observado com a diminuição dos níveis de malondialdeído e nitrato/nitrito e aumento da glutathione reduzida, atividade enzimática da catalase e da superóxido desmutase. *In silico*, a Riparina IV demonstrou atravessar a barreira hematoencefálica, ter alta absorção gastrointestinal e afinidade para interagir com os receptores MAO-B e D2 e os transportadores de serotonina e dopamina, podendo ser uma substância promissora para o tratamento da depressão e depressão associada à ansiedade.

**Palavras-chave:** Riparina. Depressão. Monoaminas Biogênicas. Estresse Oxidativo. Neuroinflamação.

## ABSTRACT

Depression and anxiety are the most frequently occurring psychiatric disorders in society. Data from the World Health Organization show that depression is a major cause of disability in the world and is considered a public health problem, generating negative impacts on society and public systems. Overall, it is estimated that 4.4% of the world population suffers from depressive disorder and 3.6% from anxiety disorder. Theories on pathophysiology of depression are based on studies investigating psychosocial stress and related hormones, neurotransmitters, neurocircuits, neurotrophic factors, circadian rhythms, and the immune system. The aim of this study was to investigate the antidepressant and anxiolytic effects of acute treatment with Riparin IV in behavioral and neurochemical models in mice. Behavioral tests, such as forced swimming test and tail suspension test, were performed to investigate the antidepressant-like effects. Elevated plus maze and hole-board test were used to investigate anxiolytic-like effects. Open field and Rotarod, to evaluate spontaneous locomotor activity and motor coordination. In addition, the effects of riparin IV on neurochemicals tests such as monoamines and their metabolites, on cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and oxidative stress in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum were evaluated and computational prediction of the pharmacokinetics, affinity and mode of binding of Riparin IV to monoaminergic and GABAergic neurotransmission targets. This project was approved by the animal research ethics committee of the Federal University of Ceará. The results showed that riparin IV produced antidepressant-like and anxiolytic-like behavioral effects without modifying locomotor activity and motor coordination. The substance increased levels of monoamines and their metabolites in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum of mice. In addition, the involvement of the noradrenergic ( $\alpha_2$ ), dopaminergic (D1 and D2), serotonergic (5-HT<sub>2A/2C</sub> and 5-HT<sub>3</sub>) and GABAergic systems in the mechanism of action of Riparin IV and a neuroprotective effect, mainly in the hippocampal region, observed with the decrease of malondialdehyde and nitrate / nitrite levels and the increase of reduced glutathione, catalase and superoxide desmutase enzyme activity. *In silico*, riparin IV has been shown to cross the blood-brain barrier, to have high gastrointestinal absorption and to have affinity to interact with the MAO-B and D2 receptors and serotonin and dopamine transporters, and may be a promising substance for the treatment of depression and associated depression anxiety.

**Keywords:** Riparin. Depression. Biogenic Monoamines. Oxidative Stress. Neuroinflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Fármacos utilizados no tratamento da Depressão.....	20
Figura 2	- Desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio e sistemas antioxidantes participantes do estresse oxidativo.....	24
Figura 3	- Formação de Espécies Reativas de Oxigênio e a capacidade da célula de neutralizar essas moléculas, levando a morte ou sobrevivência celular.....	26
Figura 4	- Defesas antioxidantes na proteção contra os radicais livres e a peroxidação lipídica.....	27
Figura 5	- Citocinas pró e anti-inflamatórias que podem ser utilizadas como biomarcadores na depressão.....	28
Figura 6	- Receptor ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABA <sub>A</sub> ).....	31
Figura 7	- Estrutura química das Riparinas I, II, III e IV.....	33
Figura 8	- Estrutura química da tiramina.....	33
Figura 9	- Efeitos farmacológicos das Riparinas I, II, III e IV.....	35
Figura 10	- Testes realizados para a investigação da atividade antidepressiva e ansiolítica da Riparina IV.....	40

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Famílias de receptores de dopamina e sua distribuição no Sistema Nervoso Central.....	22
Quadro 2	- Fármacos utilizados no tratamento da ansiedade.....	32
Quadro 3	- Substâncias utilizadas nos testes comportamentais e neuroquímicos.....	39
Quadro 4	- Avaliação da farmacodinâmica antidepressiva utilizando antagonistas específicos no teste comportamental do nado forçado.....	42
Quadro 5	- Cálculo da porcentagem do número de entradas nos braços abertos e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos.....	43
Quadro 6	- Esquema do tratamento para avaliar o envolvimento do receptor GABA <sub>A</sub> .....	44
Quadro 7	- Resumo dos dados comportamentais, monoaminérgicos e do estresse oxidativo após a administração aguda da Riparina IV.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensionais
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
AD	Aldeído Desidrogenase
ADT	Antidepressivos Tricíclicos
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
ANOVA	Análise de Variância
BUP	Bupropiona
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina
CAT	Catalase
CE	Corpo Estriado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COMT	Catecol-O-metiltransferase
COOH <sup>-</sup>	Peróxido Lipídico
CPF	Córtex pré-frontal
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido Diidroxifenilacético
DSM-5	5º Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DTNB	5,5'ditiobis,ácido 2 – nitrobenzóico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPM	Erro Padrão da Média
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FLU	Fluoxetina
FLZ	Flumazenil
GABA	Ácido $\gamma$ -Aminobutírico
GP <sub>x</sub>	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HIP	Hipocampo
HO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peridroxil
HVA	Ácido Homovanílico
i-MAO	Inibidores da Monoamina Oxidase
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleucina
IMP	Imipramina
IOI	Ioimbina
IP3	Inositol Trifosfato
IRND	Inibidores da Recaptação de Noradrenalina e Dopamina
IRSN	Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
LCE	Labirinto em Cruz Elevada
LOO <sup>-</sup>	Radicais peróxidos lipídicos
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPS	Lipopolissacarídeos
MAO	Monoamina Oxidase
MDA	Malondialdeído
NA	Noradrenalina
NBT	Azul de Nitrotetrazólio
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEBF	Número de entradas nos braços fechados
NEED	N-naftil-etilenodiamina
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
OND	Ondansetrona
ONOO <sup>-</sup>	Radicais peroxinitrito
ONOOH	Peroxinitrito
PEBA	Porcentagem de entrada nos braços abertos
pH	Potencial Hidrogeniônico

PRA	Prazosina
PTBA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RipIV	Riparina IV
RIT	Ritanserina
RPM	Rotações por Minuto
SCH	SCH23390
SERT	Transportador de recaptção de serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
SUL	Sulpirida
TBARS	Substâncias Ácidas Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - Alfa
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	Tempo de permanência nos braços fechados
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
v.o.	Via Oral



## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1	<b>Depressão: aspectos clínicos, terapêuticos e fisiopatológicos</b> .....	19
2.2	<b>Ansiedade: fisiopatologia e tratamento</b> .....	29
2.3	<b>Atividades Farmacológicas das Riparinas</b> .....	32
2.4	<b>Modelagem <i>in silico</i> no desenvolvimento de fármacos</b> .....	36
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	37
3.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	37
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	38
4.1	<b>Animais</b> .....	38
4.2	<b>Substâncias</b> .....	38
4.3	<b>Desenho experimental</b> .....	39
4.4	<b>Curva Dose-resposta</b> .....	40
4.5	<b>Testes Comportamentais</b> .....	41
4.6	<b>Testes Neuroquímicos</b> .....	44
4.7	<b>Estudo computacional</b> .....	49
4.8	<b>Análise Estatística</b> .....	50
5	<b>ANTIDEPRESSANT AND ANXIOLYTIC POTENTIAL OF RIPARIN IV IN MICE: PHARMACOLOGICAL, NEUROCHEMICAL AND COMPUTATIONAL EVIDENCES</b> .....	51
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	90
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	104
	<b>ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	105
	<b>ANEXO C – CERTIFICADO REVISÃO DO INGLÊS</b> .....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A depressão e a ansiedade, atualmente, são os transtornos psiquiátricos mais frequentes na sociedade. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que a depressão é uma das principais causas de incapacidade no mundo (OPS/OMS, 2017), sendo considerada um problema de saúde pública, gerando impactos negativos para a sociedade e para os sistemas públicos (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Globalmente, estima-se que 4,4% da população mundial sofre de transtorno depressivo e 3,6% de transtorno de ansiedade. No Brasil, a depressão atinge aproximadamente 5,8% da população (n = 11 548 577) e os distúrbios relacionados à ansiedade afetam 9,3% (n = 18 657 943) (WHO, 2017).

O Instituto Nacional do Seguro Social concedeu, somente em 2018 no Ceará, quatro auxílio-doença por dia para pessoas que não tinham condições de continuar trabalhando devido à depressão. Um total de 1.741 auxílios no ano, o que evidencia um aumento de 38,6% se comparado aos índices registrados em 2017 (DIARIO DO NORDESTE, 2019).

Enquanto a depressão, uma doença crônica, tem como principal característica modificação do humor, associada ou não, a alterações cognitivas, psicomotoras e vegetativas, a ansiedade, por sua vez, está relacionada com medo, ansiedade excessiva e perturbações no comportamento, caracterizada pela antecipação de uma ameaça (SOUZA, 2017). Além de manifestarem-se de forma isolada, a depressão e a ansiedade podem aparecer de forma associada.

Atualmente, no mercado, existem diversos medicamentos disponíveis para tratar estas duas patologias, porém, apresentam efeitos adversos desagradáveis, o que pode gerar abandono do tratamento, elevado tempo de latência para o efeito terapêutico (em média de 15 dias), o que é preocupante para uma doença associada a alto índice de suicídio, e oneroso custo do tratamento. Frente a isso, fica evidente a necessidade de desenvolver novos fármacos que possam apresentar melhor eficácia, diminuição da latência do efeito terapêutico, diminuição das recaídas e menos efeitos adversos indesejáveis e que apresentem um menor custo do tratamento (OPAS/OMS, 2018).

O laboratório de neurofarmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), tem se esforçado na busca constante por novas substâncias capazes de tratar de forma mais eficiente os transtornos psiquiátricos. Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, o timol, o carvacrol e as Riparinas I, II e III mostraram efeitos antidepressivos, além de melhorarem os sintomas ansiosos, em testes comportamentais e neuroquímicos (DE SOUSA *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2018; MELO, 2013; OLIVEIRA, 2012; SOUSA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Devido à comprovada atividade central das Riparinas I, II e III em modelos animais, e sendo a Riparina IV um análogo estrutural dessas substâncias, torna-se interessante o estudo do seu potencial efeito antidepressivo e ansiolítico, através da investigação de seu mecanismo de ação e de possíveis efeitos antioxidantes.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Depressão: aspectos clínicos, terapêuticos e fisiopatológicos.

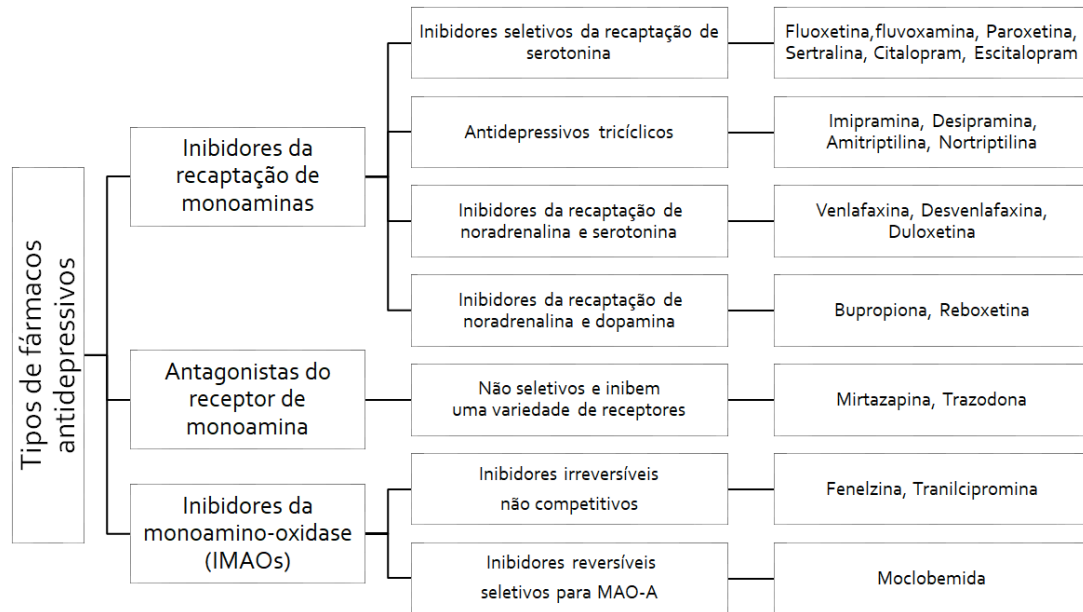
A depressão é uma doença comum em todo o mundo, com uma estimativa de 350 milhões de pessoas afetadas, sendo sua prevalência maior entre as mulheres. Esta doença pode ser entendida como uma perturbação caracterizada pela tristeza, perda de interesse e do prazer, sentimentos de culpa e baixa autoestima, alteração do sono, do apetite, cansaço excessivo e baixa concentração (OPAS/OMS, 2017; SOUSA *et al.*, 2017).

De acordo com a AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014 os transtornos depressivos podem ser classificados em: transtorno disruptivo da desregulação do humor, transtorno depressivo maior, transtorno depressivo persistente, transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno depressivo induzido por medicamento, transtorno depressivo devido a outra condição médica, outro transtorno depressivo especificado e transtorno depressivo não especificado. Tem como característica comum a presença de humor triste, vazio ou irritável, acompanhado de alterações somáticas e cognitivas.

O transtorno depressivo maior é caracterizado por episódios distintos, de pelo menos duas semanas de duração, envolvendo alterações no afeto, na cognição, em funções neurovegetativas e remissões interepisódicas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; HIRSCHFELD, 2014).

Os antidepressivos, medicamentos que apresentam mecanismos de ação levemente diferentes, são amplamente utilizados no tratamento dos transtornos depressivos. Estão disponíveis no mercado diferentes classes desses fármacos, a saber: inibidores da monoamina oxidase (i-MAO), antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN), inibidores de recaptação/antagonistas de serotonina, antagonista alfa-2 com ação serotoninérgica e noradrenérgica, inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina (IRND) (Figura 1). A maioria deles tem eficácia terapêutica semelhante, e a maior vantagem clínica dos demais antidepressivos frente aos i-MAO e ADT parece estar relacionada com a ausência de cardiotoxicidade e menor prevalência de efeitos adversos anticolinérgicos do que com a sua eficácia em tratar a depressão (CIPRIANI *et al.*, 2018; DE SOUSA *et al.*, 2015; SCHENKEL *et al.*, 2016).

Figura 1 - Fármacos utilizados no tratamento da Depressão.



Fonte: Adaptado de RANG *et al.* (2016).

As teorias disponíveis sobre a fisiopatologia da depressão são baseadas em estudos que investigam o estresse psicossocial e seus hormônios, os neurotransmissores (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e GABA), os neurocircuitos, os fatores neurotróficos, o ritmo circadiano e o envolvimento do sistema imune (SOUZA, 2017; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

### 2.1.1 Neurotransmissores Monoaminérgicos e Depressão

Funções monoaminérgicas alteradas estão relacionadas a fisiopatologia do transtorno depressivo. Essa teoria sugere que a depressão seja consequência de uma menor disponibilidade de monoaminas cerebrais, em especial de serotonina e noradrenalina. Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação da maioria dos antidepressivos, que se baseia no aumento desses neurotransmissores na fenda sináptica. (OGAWA; TSUCHIMINE; KUNUGI, 2018; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

O sistema monoaminérgico tem origem em pequenos núcleos no tronco cerebral e mesencéfalo, projetando-se pelo córtex e sistema límbico, e é composto por neurônios que contêm serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), dopamina (DA), que são liberados e ligam-se em receptores encontrados em neurônios pós-sinápticos. Em pacientes depressivos ocorre uma diminuição dos níveis sinápticos desses neurotransmissores que, junto com a acetilcolina, exercem efeitos de modulação e integração de atividades corticais e subcorticais e na regulação da

atividade psicomotora, apetite, sono e do humor (BAHLS, 1999; MARATHE *et al.*, 2018; VIANA *et al.*, 2018).

A serotonina, produto da hidroxilação e carboxilação do triptofano, é produzida no núcleo da rafe e distribuída por todo cérebro. É secretada por neurônios serotoninérgicos e age em receptores pré e pós-sinápticos. Foram caracterizados múltiplos subtipos de receptores de 5-HT e todos eles, à exceção do 5-HT<sub>3</sub> que é do tipo canal iônico regulado por ligante, estão acoplados à proteína G. Em geral, os receptores 5-HT<sub>1</sub> inibem a adenilil ciclase, os 5-HT<sub>2</sub> aumentam a renovação do fosfatidilinositol e os 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> estimulam a adenilil ciclase (REIS, 2007).

Evidências apontam o envolvimento de vários subtipos de receptores 5-HT na ansiedade e depressão. A ativação de 5-HT<sub>1A</sub> reduz a liberação de serotonina por *feedback* negativo nos neurônios do núcleo de rafe, estando associado a ansiedade na idade adulta (BLIER *et al.*, 1998; RICHARDSON-JONES *et al.*, 2011). Os receptores 5-HT<sub>1B</sub> podem ser um importante alvo farmacológico no tratamento da depressão, pois estão associados na reatividade ao estresse e, ao contrário dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, estão localizados em terminais pré-sinápticos serotoninérgicos e não serotoninérgicos em todo o cérebro, inibindo a liberação de neurotransmissores (LIU *et al.*, 2015; NAUTIYAL *et al.*, 2016; NEUMAIER; EDWARDS; PLOTSKY, 2002; RUF; BHAGWAGAR, 2009).

Os receptores 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub> são expressos em várias estruturas límbicas como o hipocampo (HIP), amígdala e córtex pré-frontal (CPF). A superatividade dos 5-HT<sub>2C</sub> pode contribuir para a etiologia da depressão e ansiedade uma vez que vítimas de suicídio apresentam níveis aumentados desses receptores. Por sua vez, os 5-HT<sub>3</sub> desempenham papel importante na função cognitiva e emocional (WACKER *et al.*, 2013; YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017).

A serotonina interfere sobre quase todas as funções cerebrais, estimulando ou inibindo GABA, o que leva a regulação do humor, sono/vigília, atividade sexual, apetite, do ritmo circadiano, fenômenos cognitivos, entre inúmeros outros efeitos (DE DEURWAERDÈRE; DI GIOVANNI, 2017; OLIVIER *et al.*, 2017). Um dos mecanismos para o término da ação desse neurotransmissor dá-se-a pelo transportador de recaptção de serotonina (SERT), uma proteína transmembrana pertencente à família de transportadores de neurotransmissores dependente de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, que capta a serotonina, regulando seus níveis na sinapse. Um outro processo é a degradação enzimática pela enzima monoamina oxidase (MAO) que converte a serotonina em 5-hidroxiindolacetaldeído (5-HIAA) (ANDREWS *et al.*, 2015).

O sistema noradrenérgico, por sua vez, modula a vigília, respostas ao estresse, função neuroendócrina, controle da dor e atividade do sistema nervoso simpático. A ação da

noradrenalina se dá por meio de receptores adrenérgicos, classificados como  $\alpha$  e  $\beta$ , tendo maior afinidade por receptores do tipo  $\alpha$ , particularmente  $\alpha_2$  (PYTKA *et al.*, 2016; WATERHOUSE; NAVARRA, 2018). A noradrenalina está envolvida na excitação física e mental, bem como na regulação do humor. O *locus ceruleus*, localizado na ponte, é um sistema de projeção generalizado que libera NA para todo o SNC (WATERHOUSE; NAVARRA, 2018).

Embora a patogenia da depressão esteja associada, tradicionalmente, pela desregulação do sistema de serotonina e noradrenalina, estudos apontam, também, o envolvimento do sistema dopaminérgico na fisiopatologia da depressão. A dopamina, um neurotransmissor catecolamínico, é precursor da norepinefrina e da epinefrina, e está envolvida em muitos sintomas observados na depressão, como a anedonia e falta de motivação (GRACE, 2016; LANDSBERG, 2018). Este neurotransmissor é oxidado a ácido diidroxifenilacético (DOPAC) pela ação sequencial das enzimas MAO e aldeído desidrogenase (AD). A seguir, a catecol-O-metiltransferase (COMT) oxida o DOPAC a HVA, o metabólito mais estável da dopamina, que é excretado na urina (STANDAERT; GALANTER, 2009).

Cinco subtipos de receptores de dopamina (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>) são conhecidos e medeiam essencialmente todas as suas funções fisiológicas que incluem movimento voluntário, recompensa, regulação do sono, afeto, atenção, além de influenciar o sistema imunológico, as funções cardiovascular, renal, gastrointestinal, entre outras (BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015). Originalmente, as propriedades dos receptores de dopamina foram classificadas de acordo com seu efeito sobre a formação de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). A ativação dos receptores de classe D<sub>1</sub> leva a um aumento do cAMP, enquanto dos receptores D<sub>2</sub> inibe a sua produção. A classe D<sub>1</sub>-símile contém dois receptores de dopamina (D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>), enquanto a classe D<sub>2</sub>-símile contém três receptores (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>) (Quadro 1) (STANDAERT; GALANTER, 2009).

Quadro 1 - Famílias de receptores de dopamina e sua distribuição no Sistema Nervoso Central.

Família do Receptor D1 (D1-símile)		Família do Receptor D2 (D2-símile)			
Sistemas de segundos mensageiros	↑cAMP (proteína G estimulatória)		↓cAMP (proteína G inibitória)		
Distribuição no SNC	D1	D5	D2	D3	D4
	Estriado Neocórtex	Hipocampo Hipotálamo	Estriado Substância negra Hipófise	Tubérculo olfatório Nucleus accumbens Hipotálamo	Córtex frontal Medula oblonga Mesencéfalo

Fonte: Adaptado de Standaert e Galanter (2009).

Evidências indicam que não é uma disfunção no próprio sistema de DA, mas a rupturas dentro de sistemas relacionados que fornecem controle aferente do sistema dopaminérgico. Assim, a maioria dos estudos que destacam o papel do sistema de DA na depressão convergem para uma regulação negativa desse sistema (BELUJON; GRACE, 2017).

A disfunção da neurotransmissão dopaminérgica no sistema mesolímbico pode contribuir para a anedonia, perda de motivação e retardo psicomotor em transtornos depressivos graves. A anedonia, definida como interesse diminuído em resposta a estímulos que anteriormente eram percebidos como recompensadores, é um sintoma particularmente difícil de tratar e os antidepressivos como os ISRS não são eficazes no tratamento de déficits de afeto positivo, como a motivação e o comprometimento cognitivo relacionado à recompensa na depressão (SALAMONE *et al.*, 2016).

A oxidação de serotonina, noradrenalina e dopamina por MAO é um dos principais mecanismos de geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no cérebro (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006). Por sua elevada reatividade, o  $H_2O_2$  pode reagir e formar uma série de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (ERO) e, quando não neutralizadas, podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e promover dano tecidual (MAES *et al.*, 2018).

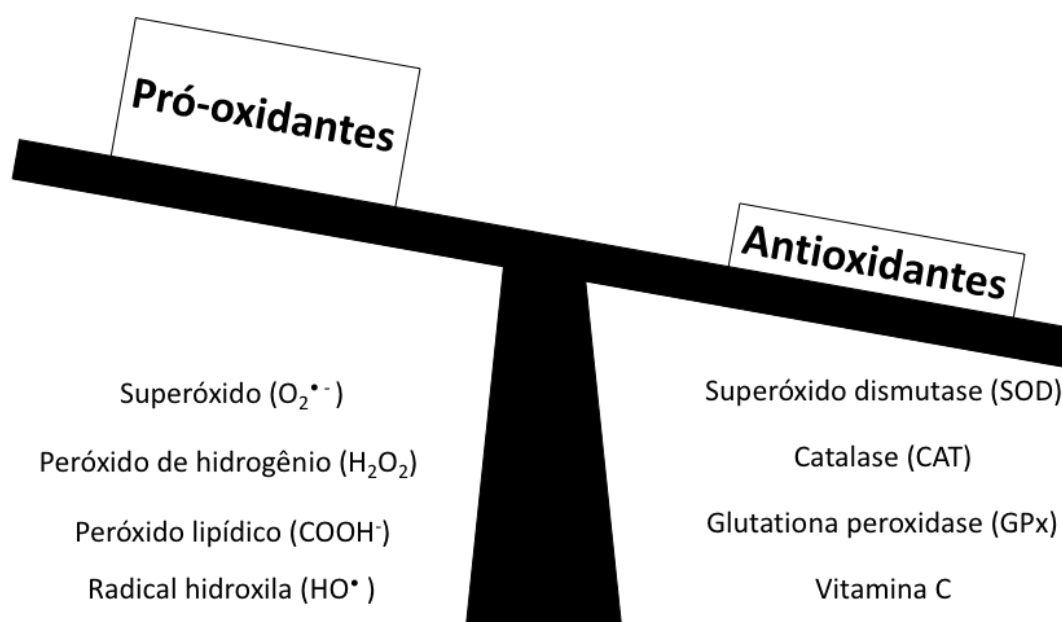
### **2.1.2 Estresse Oxidativo e Depressão**

Alterações na biologia oxidativa estão sendo reconhecidas amplamente como rota crítica do dano que envolve a fisiopatologia das doenças psiquiátricas induzidas pelo estresse (BERK, 2007). Evidências sugerem que o estresse oxidativo pode estar aumentado em distúrbios psiquiátricos, incluindo a depressão (PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013).

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a sua remoção através de sistemas enzimáticos ou não enzimáticos (Figura 2). Danos oxidativos em células e órgãos podem ser causados por radicais livres (superóxido, radical hidroxila) ou moléculas não radicais, como o peróxido de hidrogênio e seus derivados e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (ĎURAČKOVÁ, 2014; HALLIWELL, 2000).



Figura 2 – Desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio e sistemas antioxidantes participantes do estresse oxidativo.



Fonte: Autoria própria.

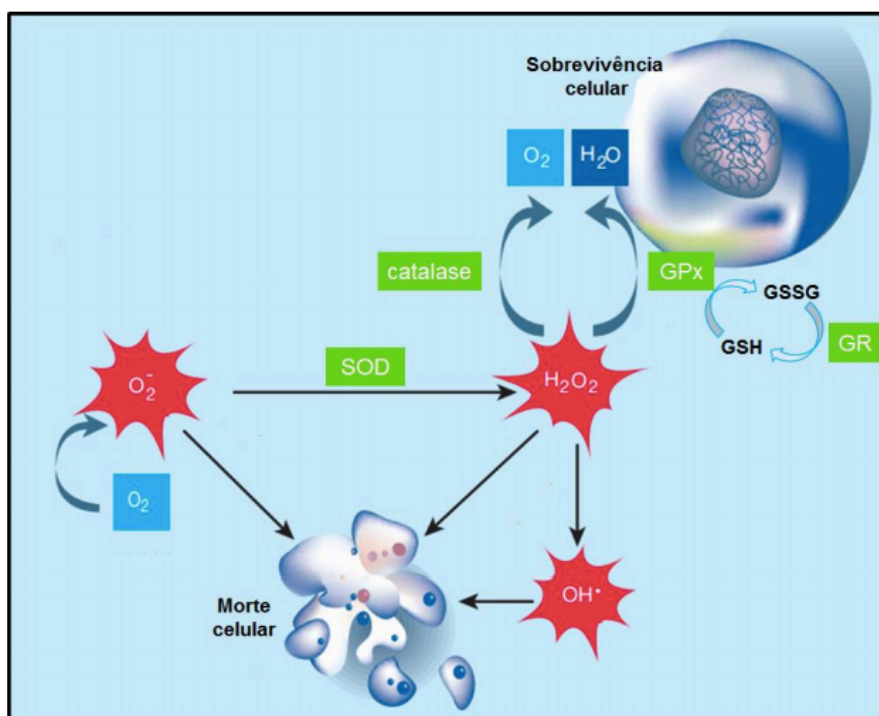
Os radicais livres causam danos estruturais em proteínas, lipídios e no ácido desoxirribonucleico (DNA), levando a apoptose e morte celular (SIWEK *et al.*, 2013). Tem sido sugerido que o aumento do estresse oxidativo e a redução das defesas antioxidantes desempenham um papel na fisiopatologia da depressão (BLACK *et al.*, 2015).

Existe muitos biomarcadores para mensurar a extensão do estresse oxidativo. Até o momento, não há consenso sobre os biomarcadores mais apropriados e a validade de muitos ainda deve ser estabelecida (JORDAN *et al.*, 2018). Níveis de antioxidantes são apenas informativos da homeostase redox, portanto seus níveis diminuídos não significam, necessariamente, dano oxidativo (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Estudos mostram de forma bastante consistente que a peroxidação lipídica expressa pelo malondialdeído (MDA), medida com o ensaio de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), está aumentada na depressão (PALTA *et al.*, 2014). O MDA é o produto da reação entre espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e lipídios poli-insaturados. Este método tem como limitação o fato do MDA não ser um produto específico da peroxidação lipídica, podendo o próprio ensaio TBARS gerar MDA, causando superestimação dos níveis. Portanto, o MDA não pode ser considerado uma representação ótima do estresse oxidativo *in vivo*, mas há características do teste TBARS que o tornam útil como testes de triagem (GHANI *et al.*, 2017).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre encontrado na maioria das células e nos fluidos extracelulares. Está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Sua mensuração é tecnicamente difícil, pois o NO tem uma meia-vida biológica curta (estimada em segundos) devido à sua rápida reação com uma variedade de moléculas (HILL *et al.*, 2010). A principal via para o metabolismo do NO é a sua oxidação em nitrito e nitrato. O nitrito tem meia-vida de alguns minutos e pode, ainda, ser oxidado a nitrato, que possui meia-vida superior. Em geral, as técnicas de medição do NO podem ser diretas (o alvo da medição é o próprio NO) ou indiretas, sendo a mensuração de nitrito/nitrato bastante utilizada (método indireto) (CSONKA *et al.*, 2015).

Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo incluem, ainda, uma cascata de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), que acelera a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) a oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é posteriormente desintoxicado pelas enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). A ação coordenada da SOD com as enzimas GPx e CAT protege contra o dano oxidativo por decompor o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ , (HALLIWELL, 2007; SCHREIBELT *et al.*, 2007). A detoxificação de peróxidos exercida pela GPx é acoplada a diminuição da disponibilidade de glutaciona reduzida (GSH), devido a sua oxidação, a qual forma glutaciona oxidada (GSSG), que pode ser reduzida a GSH por uma enzima chamada glutaciona redutase (GR) (Figura 3 e Figura 4) (GODLEWSKA; NEAR; COWEN, 2015; ZITKA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Formação de Espécies Reativas de Oxigênio e a capacidade da célula de neutralizar essas moléculas, levando a morte ou sobrevivência celular

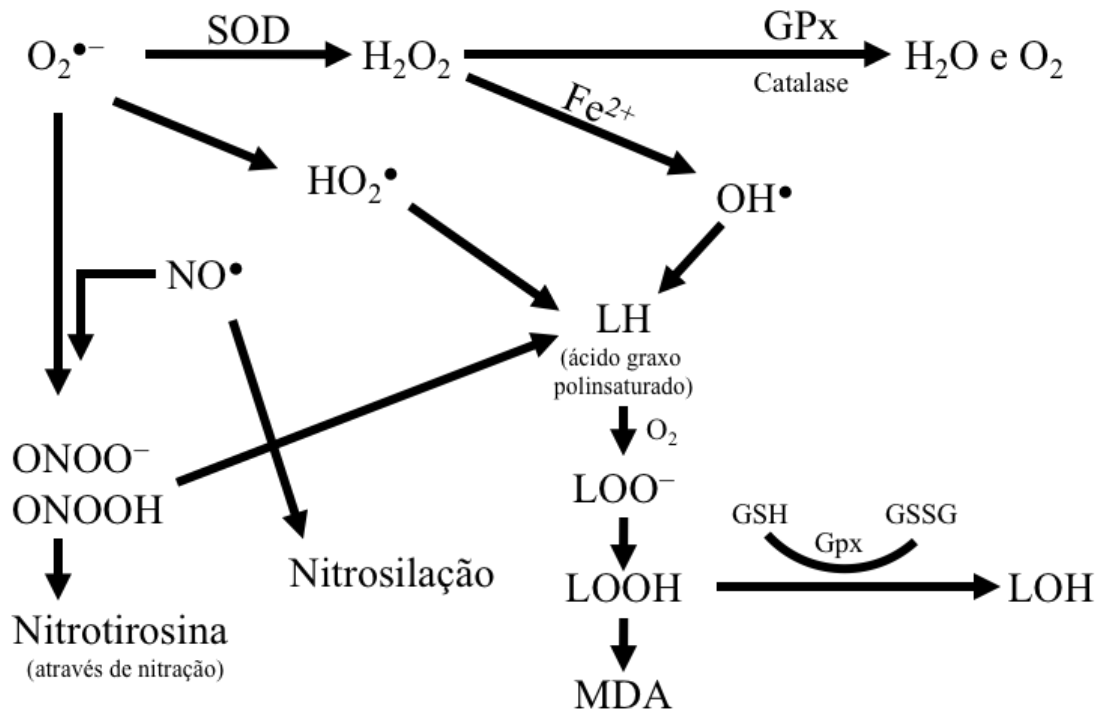


Fonte: BETTIO (2016).

Legenda: Superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Oxigênio (O<sub>2</sub>), Água (H<sub>2</sub>O), Radical Hidroxila (OH•), Superóxido Dismutase (SOD), Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Glutaciona Peroxidase (GPX), Glutaciona Redutase (GR), Glutaciona Reduzida (GSH), Glutaciona Oxidada (GSSG).

A GSH desempenha um papel importante na defesa antioxidante, no metabolismo de nutrientes e na regulação do metabolismo celular. Tem sido demonstrado que alguns distúrbios psiquiátricos são caracterizados pela depleção de GSH. O desequilíbrio redox da GSH pode ser uma causa primária de distúrbios cerebrais podendo, assim, ser usada como um biomarcador para o diagnóstico dessas doenças (AHMAD *et al.*, 2012; GAWRYLUK *et al.*, 2011; LAPIDUS *et al.*, 2014; MORRIS *et al.*, 2014; SCHAIRER *et al.*, 2013).

Figura 4 – Defesas antioxidantes na proteção contra os radicais livres e a peroxidação lipídica.



Fonte: Figura adaptada de Maes e colaboradores (2018).

Legenda: Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), superóxido dismutase (SOD), peróxidos ( $H_2O_2$ ), glutaciona peroxidase (Gpx), íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ), radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), radicais peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), per-hidroxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), radicais peróxidos lipídicos ( $LOO^{\bullet}$ ), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOOH), glutaciona peroxidase (GPx)

A depressão também está associada, além da redução das concentrações de antioxidantes e aumento dos níveis de estresse oxidativo, a processos inflamatórios e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (MAES *et al.*, 2011). Estudos mostram que tanto o estresse quanto a ativação subsequente de citocinas inflamatórias afetam negativamente a neurogênese e a neuroplasticidade (KOO *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Sistema Imunoinflamatório e Depressão

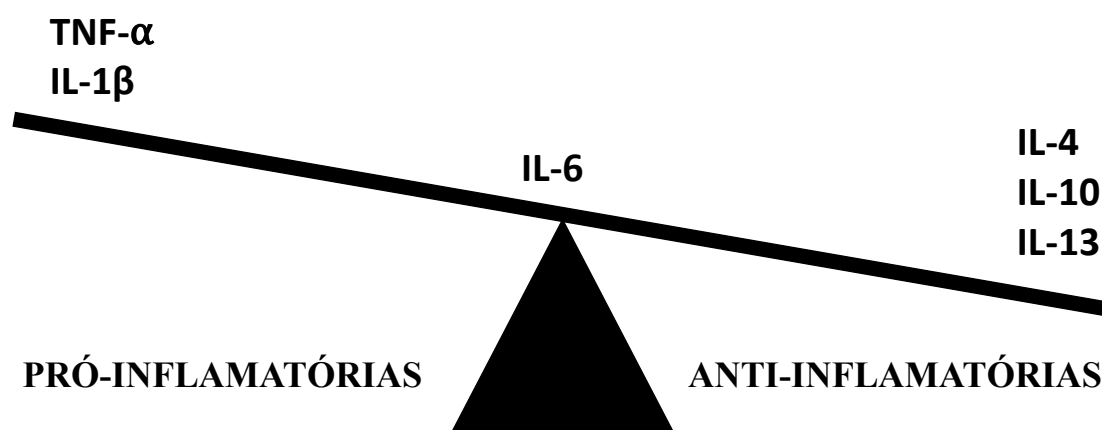
Sugere-se que os processos inflamatórios possam levar à depressão por afetar os neurotransmissores, diminuir a serotonina e induzir a toxicidade do glutamato ou aumento da atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) (MILLER; RAISON, 2016). O sistema de resposta inflamatória ativa o eixo HHA, levando à produção do hormônio liberador de

corticotrofina e do hormônio adrenocorticotrófico, além de aumentar o *turnover* de serotonina e catecolaminas (NG *et al.*, 2018).

Dos marcadores inflamatórios, aqueles que demonstram alterações na depressão são as citocinas pró-inflamatórias, principalmente as interleucinas (IL) (DOWLATI *et al.*, 2010). No geral, elas são produzidas por macrófagos, células *natural killer* e linfócitos T, mas no cérebro a sua produção ocorre, principalmente, pela microglia e astrócitos (FELGER; LOTRICH, 2013).

As citocinas são divididas em pró-inflamatórias (p.ex. IL-1 $\beta$ , a IL-6 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) e anti-inflamatórias (p.ex. IL-4, IL-10 e IL-13) (Figura 5) (HAN; YU, 2014). Elevações no sangue periférico de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são biomarcadores que podem ser utilizados na depressão, embora alguns aspectos ainda sejam discutíveis (SEKI; YOSHIDA; JAISWAL, 2018). Vários estudos, em que os níveis de citocinas encontravam-se aumentados, o tratamento com antidepressivos fez com que os índices voltassem ao normal. Os ISRS, por exemplo, reduzem os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  (HANNESTAD; DELLAGIOIA; BLOCH, 2011).

Figura 5 – Citocinas pró e anti-inflamatórias que podem ser utilizadas como biomarcadores na depressão



Fonte: Autoria própria.

A administração de lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina derivada de bactérias, tem sido amplamente utilizada para investigar os mecanismos de depressão, uma vez que o LPS causa inflamação, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , podendo levar a comportamentos depressivos (BAY-RICHTER *et al.*, 2011). A IL-1 $\beta$  suprime a proliferação do hipocampo, e o TNF $\alpha$  e a IL-6 exercem um efeito supressor

direto na neurogênese do hipocampo (HACIMUSALAR; EŞEL, 2018). O hipocampo é uma estrutura cortical localizada bilateralmente nos lobos temporais do cérebro e desempenha um papel importante nas emoções e memória de longo prazo. Estudos relatam que, na depressão, o volume dessa região encontra-se reduzido (SCHOENFELD *et al.*, 2017).

A IL-1 $\beta$  atravessa a barreira hematoencefálica e altera o eixo HHA, podendo regular a recaptação de serotonina da fenda sináptica, resultando em sintomas depressivos (NG *et al.*, 2018).

Evidências mostram que a IL-6 desempenha um papel complexo e, provavelmente, contraditório em vários processos biológicos de grande importância para a saúde mental. A IL-6 não só tem efeitos inflamatórios promotores da doença, mas também fornece *feedback* negativo sobre a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (como o TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e induz a liberação de IL-10, a principal citocina anti-inflamatória do organismo (RAISON; KNIGHT; PARIANTE, 2018).

Uma metanálise mostrou que o estresse agudo aumentou IL-6 em pacientes com depressão e que os níveis dessa citocina diminuíram significativamente após o tratamento dessa patologia (GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016; STRAWBRIDGE *et al.*, 2015).

O TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante no sistema imunológico e interage com vários domínios fisiopatológicos relevantes para a depressão, incluindo o metabolismo dos neurotransmissores, a função neuroendócrina e a plasticidade sináptica. Ele pode levar a ativação do eixo HHA e de transportadores neuronais de serotonina, além de estimular a indoleamina 2,3-dioxigenase, que é responsável por catabolizar o triptofano dando origem às kinureninas, o que leva à diminuição da síntese de serotonina e promove sintomas depressivos (POSTAL; APPENZELLER, 2015). O nível elevado de TNF- $\alpha$  pode, ainda, suprimir a produção de NE no hipocampo (FASICK *et al.*, 2015).

## **2.2. Ansiedade: fisiopatologia e tratamento.**

A ansiedade é uma emoção normal em circunstância de ameaça. Por isso, acredita-se que faça parte da reação evolutiva de “luta ou fuga” para a sobrevivência. O fenômeno envolve várias áreas do encéfalo. Dentre as regiões envolvidas, a amígdala representa a estrutura chave do fenômeno, visto que a hiperatividade dos circuitos ligados a ela determina o surgimento dos sintomas ansiosos (STAHL, 2014).

De acordo com a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), os transtornos de ansiedade são classificados como: transtorno de ansiedade generalizado, de separação, induzido por substância/medicamento, devido a outra condição

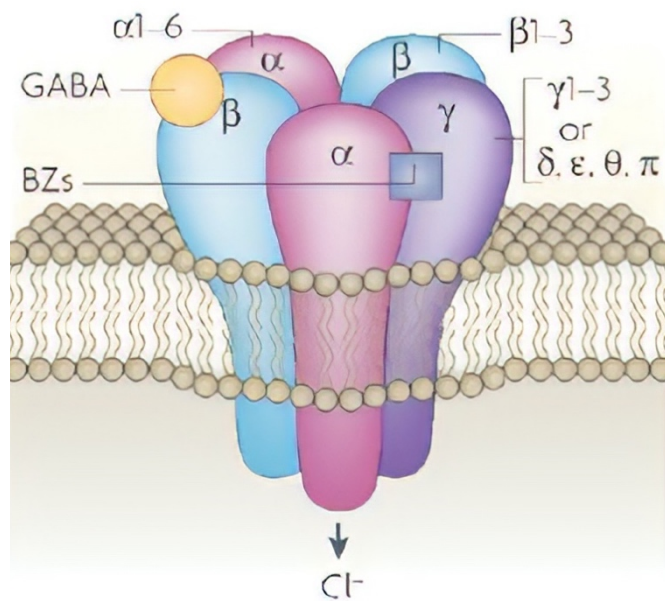
médica, especificado, não especificado, transtorno de pânico, agorafobia, fobia social, fobia específica e mutismo seletivo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Ainda que os critérios diagnósticos sejam diferentes para os diversos transtornos de ansiedade, considera-se que todos parecem ter sintomas superpostos de ansiedade ou medo associados à preocupação (STAHL, 2014).

A neurobiologia dos transtornos de ansiedade é complexa e envolve interações ambientais e genéticas. O circuito centrado na amígdala desempenha um papel crítico no sentimento de medo e na etiologia dos transtornos de ansiedade (FERNANDES; CARVALHO, 2016).

A hiperexcitação de conexões recíprocas entre amígdala e o córtex cingulado anterior e entre a amígdala e o córtex orbitofrontal estão implicados sobre os sentimentos de medo. Da mesma forma, as respostas motoras ao medo, como a luta ou fuga e a paralisação, estão relacionadas pela hiperativação recíproca entre a substância cinzenta e a amígdala. Outra conexão envolvida no medo ocorre entre a amígdala e o hipotálamo. Os neurônios hipotalâmicos são regulados pela amígdala e pelo hipocampo. (SOARES, 2017). Sabe-se que as alterações nesses circuitos têm origem neuroquímica, estando associadas com um estado de excessiva excitabilidade do sistema nervoso central (SNC) e/ ou prejuízos dos sistemas GABAérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (MANN *et al.*, 2014).

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e tem papel regulador importante na diminuição da atividade de numerosos neurônios, como os da amígdala. O GABA é sintetizado a partir do glutamato e seus principais tipos de receptores são o GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub> (GAUTHIER; NUSS, 2015; NAFFAA *et al.*, 2017; STAHL, 2014). Os receptores GABA<sub>A</sub> são canais iônicos regulados por ligante, consistindo de um aglomerado pentamérico, constituído de 18 ou mais subunidades diferentes (Figura 6). São os receptores de maior importância por possuírem um papel central na regulação da excitabilidade cerebral, através de seus efeitos inibitórios e por serem alvos de importantes drogas tais como os benzodiazepínicos, hipnóticos sedativos, barbitúricos e álcool (BRAAT; KOOY, 2015).

Figura 6 - Receptor ácido gama-aminobutírico do tipo A ( $GABA_A$ ).



Fonte: JACOB; MOSS; JURD (2008).

Os principais grupos de fármacos utilizados para tratar os transtornos ansioso são os benzodiazepínicos e os antidepressivos (Quadro 2). Os benzodiazepínicos, fármacos depressores do SNC, se ligam a subunidades específicas do receptor  $GABA_A$ , aumentando a frequência de abertura dos canais iônicos de cloreto mediados pelo GABA, sendo úteis para tratar estados de ansiedade aguda. Apresentam, como desvantagens, sedação, amnésia, hipnose, coma, indução de dependência e tolerância física. O Flumazenil é um antagonista do sítio de ligação de  $GABA_A$  para estes fármacos, sendo utilizado em casos de superdosagem (COPLAN *et al.*, 2015; SIVILOTTI, 2016).

Entre os antidepressivos, os mais eficazes nos distúrbios de ansiedade generalizada, social e fobias são os ISRS. Uma vantagem dos antidepressivos no tratamento da ansiedade é também tratar a depressão frequentemente associada, embora necessitem de, em média, três semanas para demonstrarem seus efeitos terapêuticos (BANDELOW *et al.*, 2014).



Quadro 2 – Fármacos utilizados no tratamento da Ansiedade.

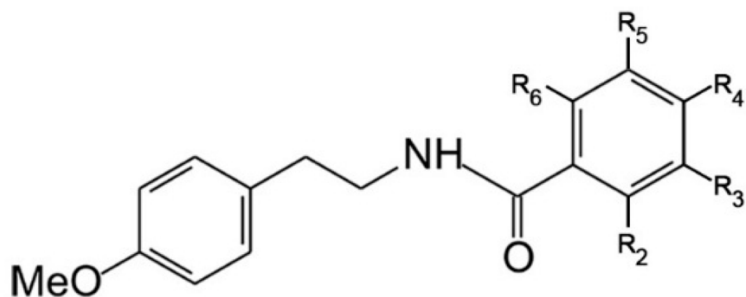
Classe	Exemplos	Mecanismo de ação	Efeitos
Benzodiazepínicos	Alprazolam Clonazepam Diazepam Estazolam Flurazepam Lorazepam Midazolam Oxazepam	Ligam-se a subunidades específicas do receptor de GABA <sub>A</sub> em sinapses neuronais do SNC, facilitando a frequência de abertura dos canais iônicos de cloreto mediados pelo GABA – aumento da hiperpolarização da membrana.	Efeitos depressores dependentes da dose sobre o SNC, incluindo sedação e alívio da ansiedade, amnésia, hipnose, anestesia, coma e depressão respiratória.
Barbitúricos	Amobarbital Butobarbital Pentobarbital Fenobarbital Secobarbital	Ligam-se a subunidades específicas do receptor de GABA <sub>A</sub> em sinapses neuronais do SNC, aumentando a duração de abertura dos canais iônicos de cloreto mediados pelo GABA – aumento da hiperpolarização da membrana.	Efeitos depressores dependentes da dose sobre o SNC, incluindo sedação e alívio da ansiedade, amnésia, hipnose, anestesia, coma e depressão respiratória. Relação dose-resposta mais acentuada que a dos benzodiazepínicos.
Agonista do receptor de 5-HT	Buspirona	Mecanismo incerto: agonista parcial dos receptores de 5-HT, mas também com afinidade pelos receptores D2.	Início lento (1-2 semanas) dos efeitos ansiolíticos, comprometimento psicomotor mínimo.

Fonte: Adaptado de Katzung; Masters e Trevor (2017).

### 2.3. Atividades Farmacológicas das Riparinas

A partir do fruto não maduro da planta *Aniba riparia* foram isoladas algumas alcaloides, tais como o éter metílico de N-benzoil-tiramina (Riparina I), (O-metil)-N-2-hidroxi-benzoil-tiramina (Riparina II) e (O-metil)-N-2,6-dihidroxi-benzoil-tiramina (Riparina III) (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). BARBOSA-FILHO; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1990, posteriormente sintetizaram essas alcaloides naturais (Figura 7). A Riparina IV (RipIV) é uma das substâncias sintéticas que possui o mesmo núcleo das Riparinas isoladas da *Aniba riparia*.

Figura 7 - Estrutura química das Riparinas I, II, III e IV.



Riparina I –  $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$

Riparina II –  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$

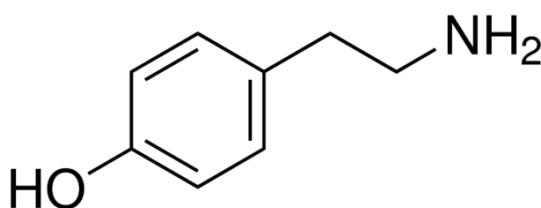
Riparina III –  $R_2 = R_6 = OH$ ;  $R_3 = R_4 = R_5 = H$

Riparina IV –  $R_2 = R_6 = H$ ;  $R_3 = R_4 = R_5 = OMe$

Fonte: NASCIMENTO *et al.* (2016a).

As Riparinas, forma como foi denominada essas alcaloides (BARBOSA-FILHO, 1997), são alcaloides não heterocíclicos, mais especificamente uma alcaloide formada pela união da tiramina e do ácido benzoico (ARAÚJO, 2007; CARVALHO, 2011). A estrutura química das Riparinas mostrou-se interessante para que testes neurocomportamentais fossem iniciados. O interesse advém do fato de essas substâncias apresentarem em sua estrutura química uma molécula com reconhecida atividade central, a tiramina, o que aponta para uma possível ação central das Riparinas. No cérebro, a tiramina é produzida endogenamente e parece funcionar modulando os efeitos da dopamina. A tiramina (Figura 8) é degradada pela MAO, tipos A e B, encontrados na superfície externa da membrana externa da mitocôndria (SCHMIDT; FERGER, 2004).

Figura 8 - Estrutura química da Tiramina.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2018).

De Sousa e colaboradores (2005, 2014) demonstraram que a Riparina I tem efeitos no sistema nervoso central com efeitos ansiolíticos e antidepressivos, provavelmente por sua

interação com os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico. A Riparina I, ainda, foi capaz de diminuir tanto a nocicepção quanto o volume do edema de pata induzidos por glutamato, sugerindo que possa atuar como antagonista dos receptores glutamatérgicos envolvidos no processo inflamatório. Assim, esta substância apresenta propriedades anti-inflamatórias pela inibição de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, glutamato e óxido nítrico, sem aparentemente nenhum envolvimento do sistema opioide neste processo (ARAÚJO, 2007).

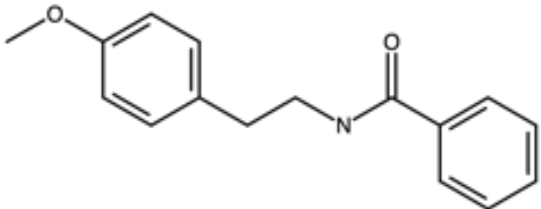
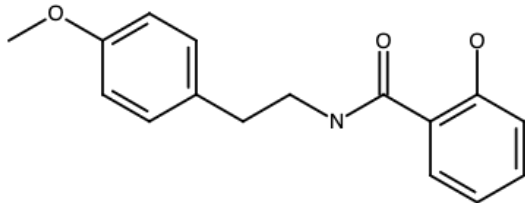
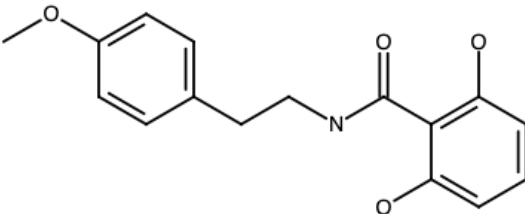
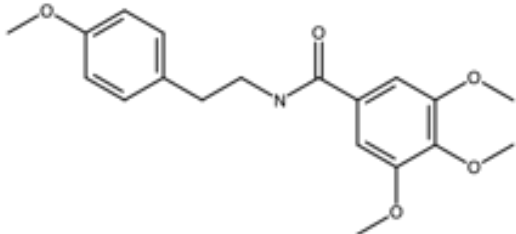
Investigações prévias com a Riparina II demonstraram que esta molécula apresenta atividade antinociceptiva, evidenciada nos modelos de nocicepção química induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato. Foi demonstrado, também, que a administração de Riparina II desencadeia em camundongos efeitos ansiolítico e antidepressivo que são desprovidos de interferência da atividade locomotora espontânea (DE SOUSA *et al.*, 2007; LEITE, 2008; LOPES *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Estudos com Riparina III demonstraram sua eficácia no tratamento da depressão associada à ansiedade (MELO, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2015), além do efeito antinociceptivo em modelos de dor em camundongos, podendo sua ação está relacionada com receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos, dopaminérgicos, opioide e sistema oxidonitrérgico (VASCONCELOS *et al.*, 2015; VASCONCELOS, 2015).

Devido à comprovada atividade central das Riparinas I, II e III em modelos animais, e sendo a Riparina IV um análogo estrutural dessas substâncias, torna-se interessante a investigação do seu potencial farmacológico, dado que os tratamentos dos transtornos depressivos e de ansiedade representam desafios para os sistemas de saúde, frente à necessidade de tratar pacientes de forma mais eficaz, diminuindo efeitos adversos e tempo de latência, melhorando, assim, os cuidados gerais de saúde mental (Figura 9) (CIPRIANI *et al.*, 2018).

Atualmente, há um debate preocupante sobre a eficácia e custo dos tratamentos dos transtornos psiquiátricos, em especial a depressão, em que os benefícios de curto prazo são, no geral, modestos, e o balanço de benefícios e danos a longo prazo é frequentemente pouco estudado. Portanto, a inovação na psicofarmacologia é de importância crucial e necessária (CIPRIANI *et al.*, 2018).

Figura 9 – Efeitos farmacológicos das Riparinas I, II, III e IV.

MOLÉCULA	ORIGEM	EFEITOS FARMACOLÓGICOS
RIPARINA I 	NATURAL	Anticonvulsivante Antidepressivo e ansiolítico Antimicrobiana Antinociceptivo Hipotensor Miorrelaxante
RIPARINA II 	NATURAL	Anti-inflamatório Anticonvulsivante Antidepressivo e ansiolítico Antimicrobiana Antinociceptivo Hipotensor
RIPARINA III 	NATURAL	Anti-inflamatório Anticonvulsivante Antidepressivo e ansiolítico Antimicrobiana Antinociceptivo Espasmódico Hipotensor Miorrelaxante
RIPARINA IV 	SINTÉTICA	Anti-inflamatório Antimicrobiana Antinociceptivo

Fonte: ARAÚJO, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2009; CARVALHO, 2016; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000; CATÃO *et al.*, 2005; DE SOUSA *et al.*, 2005, 2007, 2014; DIAS, 2012; LEITE, 2008; LOPES *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2016b; OLIVEIRA, 2012; SEIXAS, 1996; SOUSA *et al.*, 2004, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2013; THOMAS *et al.*, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 2015; VASCONCELOS, 2015.

#### 2.4. Modelagem *in silico* no desenvolvimento de fármacos

A modelagem *in silico* desempenha um papel significativo na pesquisa farmacêutica, funcionando como um meio eficiente de identificar potenciais compostos bioativos e auxiliar no desenvolvimento de possíveis drogas para diversas doenças (HASSAN BAIG *et al.*, 2016). Atualmente, estão disponíveis vários modelos computacionais para a previsão eficaz e bem-sucedida das propriedades de compostos, tais como a solubilidade, pKa, permeabilidade, biodisponibilidade oral, penetração na barreira hematoencefálica, permeação cutânea, metabolismo, volume de distribuição, ligação às proteínas, transportadores, depuração, predição de toxicidade e propriedades farmacodinâmicas (GHOSH *et al.*, 2016; YANG; VALERIO; ARVIDSON, 2009).

Uma das abordagens para a pesquisa virtual de fármacos consiste em utilizar um banco de dados com alvos moleculares de interesse farmacêutico e realizar uma triagem reversa, ou seja, analisar uma molécula frente a esses diversos alvos, para identificar as proteínas com forte afinidade de ligação com a substância estudada (LI *et al.*, 2013). Os métodos de triagem reversa são importantes técnicas computacionais para identificar novos alvos macromoleculares de drogas existentes ou moléculas ativas e para analisar seus mecanismos funcionais ou efeitos colaterais, baseando-se em princípios espaciais e energéticos (PATEL *et al.*, 2015).

Apesar de uma série de aplicações bem-sucedidas do desenho assistido por computador para o design moderno de medicamentos, existem limitações. Em particular, como qualquer sistema hipotético, os resultados devem ser validados em sistemas reais, e muitas moléculas identificadas usando desenho assistido por computador falharam em exibir as atividades desejadas em sistemas biológicos (SCHNEIDER, 2010).

Para superar limitações e melhorar a precisão são necessárias atualizações regulares de ferramentas e algoritmos. A confiabilidade do banco de dados e as moléculas experimentais validadas de alta qualidade devem ser desenvolvidas e atualizadas. Os bancos de dados devem conter dados detalhados sobre genômica e proteômica, informações sequenciais de alta qualidade, propriedades físico-químicas e estruturais (SHEYNKMAN *et al.*, 2016).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito antidepressivo e ansiolítico do tratamento agudo com Riparina IV em modelos comportamentais e neuroquímicos, em camundongos.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a curva dose-resposta para escolhas das doses a serem trabalhadas.
- Avaliar os efeitos da Riparina IV nos seguintes modelos comportamentais:
  - Atividade antidepressiva-símile na suspensão da cauda, nado forçado e participação dos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos;
  - Atividade ansiolítica-símile na placa perfurada, labirinto em cruz elevado e participação do sistema GABAérgico;
  - Atividade motora e relaxante muscular no campo aberto e barra giratória, respectivamente.
- Investigar o mecanismo antidepressivo da Riparina IV através dos seguintes testes neuroquímicos:
  - Participação do sistema monoaminérgico através da determinação, por CLAE, dos níveis de monoaminas e seus metabólitos no HIP, CPF e CE;
  - Estresse oxidativo neuronal, no hipocampo (HIP), córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CE), por meio da determinação da taxa de peroxidação lipídica (níveis de MDA), produção de nitrito/nitrato, níveis de glutathiona reduzida, atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase;
  - Envolvimento do sistema neuroinflamatório através da dosagem, por ELISA, de IL-6 e TNF- $\alpha$ .
- Predizer, *in silico*, a farmacocinética e a afinidade e modo de ligação da Riparina IV a alvos da neurotransmissão monoaminérgica e GABAérgica.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade *Swiss*, adultos, do sexo masculino, pesando entre 25-30g, provenientes dos Biotérios do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvidos de Medicamentos, mantidos em caixas de propileno  $23 \pm 2$  °C, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água. Os animais foram colocados em jejum de sólidos de 5 horas, antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para a absorção das substâncias. Os animais utilizados nos testes comportamentais receberam os fármacos em dose única e foram submetidos a, no máximo, três testes distintos. Para a realização dos testes neuroquímicos, o teste do nado forçado foi utilizado como agente estressor. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, sob os processos 68/2014 (anexo I) e 72/2017 (anexo II).

### 4.2. Substâncias

A RipIV foi sintetizada no laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, pelo professor Barbosa Filho (BARBOSA-FILHO, 1997), a partir do acoplamento do éter metílico da tiramina com o éster do ácido 2,5 dihidroxibenzóico (SEIXAS, 1996). Em todos os experimentos, a RipIV foi dissolvida em tween® 80 a 3%, diluída em água destilada e administrada de forma aguda.

Na avaliação da atividade antidepressiva foram empregados como padrão referência a bupropiona 30mg/kg, a imipramina (10mg/kg, para o teste do nado forçado e 30mg/kg no teste de suspensão da cauda) e a fluoxetina 35mg/kg. Para o antagonismo dos receptores dopaminérgicos foram utilizados SCH23390 15µg/kg (D<sub>1</sub>) e sulpirida 50mg/kg (D<sub>2</sub>); dos serotoninérgicos, ritanserina 4mg/kg (5-HT<sub>2A/2C</sub>) e ondansetrona 0,1mg/kg (5-HT<sub>3</sub>), e dos noradrenérgicos, prazosina 62,5mg/kg (α<sub>1</sub>) e ioimbina 1mg/kg (α<sub>2</sub>) (DE SOUSA *et al.*, 2014; MANTOVANI, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Nos testes para avaliar a atividade ansiolítica da RipIV foram utilizados como padrão referência o diazepam nas doses de 1mg/kg e 2mg/kg e como antagonista do sistema GABAérgico o Flumazenil 2,5mg/kg (ABREU, 2013; DE SOUSA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2012) (quadro 3).

Quadro 3 – Substâncias utilizadas nos testes comportamentais e neuroquímicos.

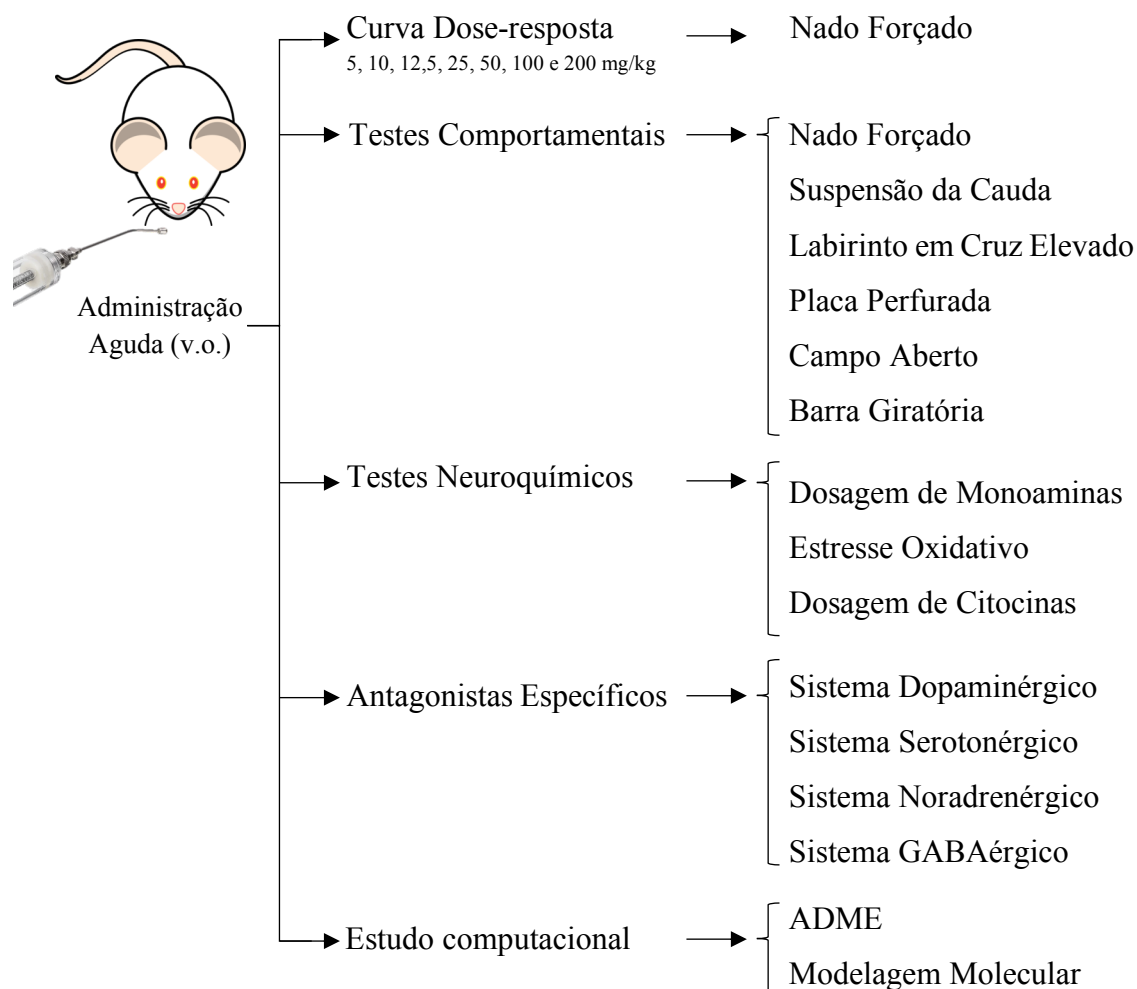
Substâncias	Fabricantes	Substâncias	Fabricantes
Bupropiona	Nova Química Brasil®	Ondansetrona	Sigma-Aldrich Brasil Ltda®
Diazepam	União Química Brasil®	Prazosina	Sigma-Aldrich Brasil Ltda®
Flumazenil	Sigma-Aldrich Brasil Ltda®	Riparina IV	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - UFPB
Fluoxetina	Sandoz Brasil®	Ritanserina	Sigma-Aldrich Brasil Ltda®
Imipramina	EMS Brasil®	SCH23390	Sigma-Aldrich Brasil Ltda®
Ioimbina	Sigma-Aldrich Brasil Ltda®	Sulpirida	Sigma-Aldrich Brasil Ltda®

### 4.3. Desenho experimental

A figura 10 mostra a sequência dos experimentos para a investigação da atividade antidepressiva e ansiolítica da Riparina IV.



Figura 10 – Testes realizados para a investigação da atividade antidepressiva e ansiolítica da Riparina IV.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.4. Curva Dose-resposta

Os animais receberam RipIV, por via oral, nas doses de 5, 10, 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/kg e o controle recebeu água destilada com tween® 80 a 3% (veículo). Após 60 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, durante 5 minutos, e mensurado o tempo de imobilidade do animal como parâmetro para a escolha das melhores doses para se trabalhar.

## **4.5. Testes Comportamentais**

### **4.5.1. Teste do Nado Forçado**

O teste do nado forçado tem sido amplamente empregado para a triagem de drogas antidepressivas e seus mecanismos de ação (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Neste teste foram utilizados tanques cilíndricos de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca até a metade do recipiente. Os animais foram separados em 6 grupos, cada um com 8 animais: bupropiona 30 mg/kg, imipramina 10 mg/kg, fluoxetina 35 mg/kg, veículo e os grupos RipIV 50 mg/kg e 100 mg/kg (todos v.o.). Após 60 minutos da administração, os animais, um por vez, foram colocados no tanque e o tempo de imobilidade, em segundos, foi registrado durante 5 minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

#### **4.5.1.1. Sistema Dopaminérgico**

Grupos distintos foram pré-tratados com SCH23390 15 µg/kg (antagonista dopaminérgico D1) ou sulpirida 50 mg/kg (antagonista dopaminérgico D2), via i.p., e após 30 minutos receberam, por v.o., veículo, Riparina IV 50 mg/kg ou bupropiona 30 mg/kg. Aguardado 60 minutos, os animais foram colocados no aparato para a realização do teste do nado forçado e foi avaliado o tempo de imobilidade, por 5 minutos.

#### **4.5.1.2. Sistema Serotonérgico**

Grupos distintos foram pré-tratados, via i.p., com ritanserina 4mg/kg, antagonista do receptor 5-HT<sub>2A/2C</sub>, ou ondansetrona 0,1mg/kg, antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>, e após 30 minutos receberam, v.o., Riparina IV 50 mg/kg ou veículo ou fluoxetina 35mg/kg. Aguardado 60 minutos, os animais foram colocados no aparato para a realização do teste do nado forçado e foi avaliado o tempo de imobilidade, por 5 minutos.

#### **4.5.1.3. Sistema Noradrenérgico**

Grupos distintos foram pré-tratados, via i.p., com prazosina 62,5 mg/kg, antagonista noradrenérgico α<sub>1</sub>, ou ioimbina 1mg/kg, antagonista noradrenérgico α<sub>2</sub>, e após 30 minutos receberam, por v.o. Riparina IV 50 mg/kg ou veículo ou imipramina 10 mg/kg. Aguardado 60 minutos, os animais foram colocados no aparato para a realização do teste do nado forçado e foi avaliado o tempo de imobilidade, por 5 minutos.

Quadro 4 - Avaliação da farmacodinâmica antidepressiva utilizando antagonistas específicos no teste comportamental do nado forçado.

Sistema	Antagonista	Grupos	Considerações
Dopaminérgico	SCH23390 (SCH) - D1  Sulpirida (SUL) - D2	1. Veículo (n=8) 2. RipIV (n=8) 3. BUP (n=6) 4. SCH + Veículo (n=6) 5. SCH + RipIV (n=8) 6. SCH + BUP (n=6) 7. SUL + Veículo (n=6) 8. SUL + RipIV (n=8) 9. SUL + BUP (n=6)	Os antagonistas foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) e os demais por v.o.
Serotonérgico	Ritanserina (RIT) - 5-HT <sub>2A/2C</sub>  Ondansentrona (OND) - 5-HT <sub>3</sub>	1. Veículo (n=8) 2. RipIV (n=8) 3. FLU (n=6) 4. RIT + Veículo (n=6) 5. RIT + RipIV (n=8) 6. RIT + FLU (n=6) 7. OND + Veículo (n=6) 8. OND + RipIV (n=8) 9. OND + FLU (n=6)	Os antagonistas foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) e os demais por v.o.
Noradrenérgico	Prazosina (PRA) - $\alpha_1$  Ioimbina (IOI) - $\alpha_2$	1. Veículo (n=8) 2. RipIV (n=8) 3. IMP (n=6) 4. PRA + Veículo (n=6) 5. PRA+RipIV (n=8) 6. PRA+ IMP (n=6) 7. IOI + Veículo (n=6) 8. IOI + RipIV (n=8) 9. IOI + IMP (n=6)	Os antagonistas foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) e os demais por v.o.

Fonte: Autoria Própria.

#### 4.5.2. Teste de Suspensão da Cauda

Este teste avalia os efeitos de antidepressivos sobre o comportamento de desamparo aprendido, que mede a duração do comportamento direcionado à fuga como uma variável associada ao efeito antidepressivo (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004). Neste experimento os animais foram separados em seis grupos (n=8): bupropiona 30 mg/kg, imipramina 30 mg/kg, fluoxetina 35 mg/kg, veículo e os grupos RipIV 50 mg/kg e 100 mg/kg (todos v.o.). Após 60 minutos da administração os animais, um por vez, foram suspensos e presos com fita adesiva a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma a 58 cm acima da bancada e, durante 6 minutos, foi observado o tempo de imobilidade do animal, em segundos (STERU *et al.*, 1985).

### 4.5.3. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Através do teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), é possível avaliar o potencial efeito ansiolítico de uma substância. Este modelo explora o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão que camundongos apresentam a altura e espaços abertos. O aparato é formado por quatro braços, dois abertos e dois fechados, ambos opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão ligados por uma plataforma central. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do chão. Para este experimento foram feitos 4 grupos, cada um com 8 animais. O padrão referência recebeu diazepam 1mg/kg, v.o., o controle veículo, v.o., um grupo experimental RipIV 50mg/kg e o outro 100mg/kg (ambos por v.o.). Após 60 minutos da administração, os animais, um por vez, foram colocados no centro do aparato com a cabeça voltada para um dos braços fechados e foram registrados o número de entradas e o tempo de permanência em ambos os braços, abertos e fechados, durante 5 minutos (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW *et al.*, 1985).

Para fins estatísticos são considerados apenas os parâmetros relacionados aos braços abertos. A porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) foi calculada dividindo-se o número de entradas nos braços abertos (NEBA) pelo número total de entradas nos braços abertos e fechados, multiplicado por 100. De forma semelhante foi calculada a porcentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos.

Quadro 5 - Cálculo da porcentagem do número de entradas nos braços abertos e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos.

CÁLCULO DO PEBA E PTBA	
$PEBA = NEBA \times 100 / (NEBA + NEBF)$	
$PTBA = TPBA \times 100 / (TPBA + TPBF)$	

Fonte: Autoria Própria.

NEBA (Número de entradas nos braços abertos); TPBF (Tempo de permanência nos braços fechados);  
 NEBF (Número de entradas nos braços fechados); PEBA (Porcentagem de entrada nos braços abertos);  
 TPBA (Tempo de permanência nos braços abertos); PTBA (Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos)

A fim de investigar o possível envolvimento do receptor GABA<sub>A</sub> no efeito ansiolítico da RipIV, foram feitos outros três grupos, cada um com 8 animais. Os animais dos três grupos foram pré-tratados com FLZ (2,5 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de receberem, por v.o.: veículo (grupo 1), RipIV 50mg/kg (grupo 2) e DPZ 1mg/kg (grupo 3). Após 60 minutos, foi

realizado o teste no LCE. Para análise estatística, o grupo FLZ + RipIV 50 foi comparado com o grupo RipIV 50, enquanto que os demais grupos foram comparados aos respectivos controles.

Quadro 6 - Esquema do tratamento para avaliar o envolvimento do recepto GABA<sub>A</sub>.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tratamento	FLZ + Veículo	FLZ + RipIV 50	FLZ + DPZ

Fonte: Autoria Própria.

FLZ: flumazenil; DPZ: diazepam; RipIV: riparina IV

#### 4.5.4. Teste da Placa Perfurada

O teste tem como aparato uma placa perfurada (60 x 30 cm) com 16 buracos espaçados uniformemente. Um aumento no número e no tempo despendido espreitando os orifícios da placa implica numa maior atividade exploratória ou uma ação ansiolítica, assim como uma redução neste parâmetro, quando comparados aos valores do grupo controle, é compatível com uma ação ansiogênia (FILE; PELLOW, 1985). Para este experimento foram analisados 4 grupos, cada um com 8 animais. O padrão referência recebeu diazepam 1mg/kg, v.o., o controle veículo, v.o., um grupo experimental RipIV 50mg/kg e o outro 100mg/kg (ambos por v.o.). Após 60 minutos da administração, os animais, um por vez, foram colocados na plataforma e registrado o número de imersões nos orifícios da placa, durante 5 minutos (CLARK; KOESTER; PEARSON, 1971).

#### 4.5.5. Teste do Campo Aberto

Este experimento avalia a atividade exploratória do animal. Foi utilizado um aparato de acrílico com paredes transparentes, piso preto e dividido em 9 quadrantes iguais. Foram feitos 4 grupos, cada um com 8 animais. O padrão referência recebeu diazepam 2mg/kg, via oral (v.o.), o controle veículo, v.o., um grupo experimental RipIV 50mg/kg e o outro 100mg/kg (ambos v.o.). Após 60 minutos da administração, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde foram registrados o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea - ALE), durante 5 minutos (ARCHER, 1973).

#### 4.5.6. Teste da Barra Giratória

O teste da Barra Giratória (*Rota Rod*) avalia o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este experimento foram feitos 4 grupos, com 8 animais cada. O padrão referência recebeu

diazepam 2mg/kg, v.o., o controle veículo, v.o., um grupo experimental RipIV 50mg/kg e o outro 100mg/kg (ambos por v.o.). Após 60 minutos da administração, os animais, um por vez, foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em 12 rotações por minuto (rpm), por um período de 1 minuto. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (DUNHAM; MIYA, 1957).

#### **4.6. Testes Neuroquímicos**

##### **4.6.1. Dosagem de Monoaminas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A cromatografia é uma técnica de separação físico-química e seu princípio é baseado na eluição de uma fase móvel através de uma coluna preenchida com uma fase estacionária. A CLAE baseia-se na distribuição dos analitos contidos em uma amostra entre a fase móvel líquida que é eluída sob alta pressão através de uma coluna cilíndrica (fase estacionária). Esta técnica apresenta consideráveis vantagens, a saber: possibilidade de aplicação em um grande número de amostras, boa precisão, tempo de análise reduzido, notável sensibilidade, boa reprodutibilidade, versatilidade (BRAGA, 2018).

A dosagem de monoaminas por CLAE foi realizada em homogenatos hipocampais, pré-corticais e estriatais em grupos pré-tratados com água destilada e tween® 80 a 3% (veículo), RipIV 50 ou 100 mg/kg, por via oral, submetidos ao teste do nado forçado e posteriormente decapitados.

No preparo dos homogenatos, utilizou-se como tampão o ácido perclórico 0,1M (HClO<sub>4</sub>), em seguida, essa mistura (amostra + tampão) foi centrifugada por 15 minutos, a 15.000 rpm e uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi injetada no aparelho para a análise.

Utilizou-se uma coluna, C18, com 25cm de comprimento, calibre de 4,6mm. A fase móvel foi preparada com 0,3g de cloreto de potássio, 19,2g de ácido cítrico, 0,520g de ácido heptanosulfônico, 0,06g de EDTA dissódico, 188mL de metanol, 42mL de acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) e q.s.p 2 litros com H<sub>2</sub>O ultrapura (Milli-Q, Millipore). A fase móvel teve o pH ajustado para 3,2 com hidróxido de sódio e, em seguida, Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação.

Noradrenalina (NE), dopamina (DA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram eletroicamente detectados usando um detector amperométrico modelo Waters 2465 (Waters, Milford, MA, USA).

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20 µl de solução de NA, DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa Microsoft Excel e os resultados expressos em µg/g de tecido.

#### **4.6.2. Estresse Oxidativo**

A investigação da atividade antioxidante de RipIV foi realizada em homogenatos hipocámpais, pré-corticais e estriatais em grupos pré-tratados com veículo, RipIV 50 ou 100 mg/kg, por via oral, submetidos ao teste do nado forçado e posteriormente decapitados para dissecação das áreas cerebrais. Estes homogenatos foram utilizados nas determinações do estresse oxidativo - substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico, dos níveis de nitrito/nitrato, da concentração de glutathione reduzida, da atividade enzimática da catalase e da superóxido dismutase.

As regiões dissecadas foram colocadas em *eppendorffs* devidamente identificados, pesados e conservados a -70°C para uso posterior. As áreas foram estocadas durante um período de no máximo 2 meses, e, quando utilizados, os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação daqueles que foram ensaiados imediatamente ou 24h após a dissecação (BURKE; GREENBAUM, 1987; FIEDLER; MARKS; COLLINS, 1987).

##### **4.6.2.1. Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).**

O grau de lipoperoxidação foi medido pela determinação das concentrações de MDA determinado pelo ensaio do TBARS, de acordo com o método de (DRAPER; HADLEY, 1990). Este teste é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malondialdeído (MDA).

Os homogenatos das áreas cereais foram preparados a 10% utilizando solução de cloreto de potássio a 1,15%. Em seguida, 63 µL do homogenato com tampão fosfato foi misturado a 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, e depois aquecido num banho de água a ferver durante 30 min. 150 µL dessa mistura foi colocado nos poços da placa de ELISA e o conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micrograma de MDA por grama de tecido.

Para a elaboração da curva-padrão de MDA foram preparadas, as soluções a 0,627, 1,247, 2,463, 4,8, 9,16 e 16,77 $\mu$ g. O branco foi de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 535nm.

#### **4.6.2.2. Determinação da produção de nitrito/nitrato**

Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonilamida formando o sal diazônico. Este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com pico de absorbância em 546nm.

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pelo método proposto por GREEN *et al.*, 1982. Em síntese, uma alíquota de 100  $\mu$ L do homogeneizado foi incubada com 100  $\mu$ L de reagente de Griess (1mL de ácido fosfórico 5% + 1mL de sulfanilamida 1 % em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% + 1mL NEED 0,1 % + 1mL de água) à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 546 nm. A concentração de nitrito/nitrato foi expressa em nM/g de tecido, a partir da curva padrão.

Os homogenatos das áreas cerebrais foram preparados a 10% (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Para a elaboração da curva dose-resposta foram pesados 6,9 mg de NaNO<sub>2</sub> e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada. Em seguida foram feitas diluições seriadas ficando, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 nM e traçado a equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1982).

#### **4.6.2.3. Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)**

A determinação da GSH foi baseada no método descrito por (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Adicionou-se 800  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4 M, potencial hidrogeniônico (pH) 8,9, a 400  $\mu$ L do homogeneizado, acrescentando 20  $\mu$ L de 5,5'ditiobis,ácido 2 – nitrobenzótico (DTNB) 0,01 M. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 412 nm e os resultados expressos em  $\mu$ g de GSH por g de tecido.

O homogenato a 10% das áreas cerebrais foi preparado em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02 M, em seguida foi retirado 400  $\mu$ L desse homogenato e adicionado 320  $\mu$ L de água destilada e mais 80  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 5000 rpm por 15 min.

Para a elaboração da curva de calibração, foram preparados 4 mL de soluções a 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu$ g/g. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4 M (pH 8,9).



Adicionou-se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e foi feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB.

#### **4.6.2.4. Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)**

Segundo Chance e Maehly (1955), a atividade da CAT baseia-se na medida da taxa de produção de  $O_2$  e  $H_2O$  na proporção em que o  $H_2O_2$ , utilizado como substrato, é hidrolisado. A ação enzimática é medida pela leitura da alteração da absorbância durante 6 minutos e os resultados expressos em U/mg de proteína.

O procedimento experimental utilizou 980  $\mu$ L do meio reacional ( $H_2O_2$ , tampão Tris-HCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0 e água Milli-Q) com 20  $\mu$ L de homogeneizado e a leitura foi feita em cubeta de quartzo em espectrofotômetro a 230 nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de (BRADFORD, 1976).

#### **4.6.2.5. Determinação da atividade enzimática da superóxido desmutase (SOD)**

No método descrito por Beauchamp e Fridovich (1971), a quantidade de SOD é avaliada medindo sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Para a determinação dessa enzima, 1mL do meio reacional (tampão fosfato 50 mM, metionina 19,5 mM, EDTA 0,1 mM) foi adicionado ao homogeneizado e, na câmara fria, adicionaram-se 300 $\mu$ L de riboflavina 1  $\mu$ M e 150 $\mu$ L de NBT 750  $\mu$ M. A leitura foi realizada após a exposição do material à luz fluorescente por 15 min em um espectrofotômetro a 560 nm. A atividade enzimática é expressa em U/mg de proteína.

#### **4.6.2.6. Dosagem de proteína pelo método de Bradford**

Este método é baseado na interação do corante Coomassie Blue G250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de interação entre a proteína e o corante, ocorre o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve em 595nm.

Para a realização do experimento adicionou-se, aos poços da placa de ELISA, albumina (em concentrações crescentes e em duplicatas, para a realização da curva padrão), amostra (tampão utilizado no homogenato + amostra, o volume final deve ser 40 $\mu$ L) e o branco (poços somente com o homogenato). Após preencher a placa foi acrescentado 200 $\mu$ L da solução de Bradford diluída, esperou-se 5 minutos e foi feita a leitura em 595nm (BRADFORD, 1976).

### 4.6.3. Dosagem de Citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$

Os animais foram divididos nos grupos RipIV 50mg/kg (v.o.) ou veículo (v.o.) e submetidos ao teste de nado forçado, sendo mensurado o tempo de imobilidade. Em seguida, os animais foram eutanasiados, retiradas as áreas cerebrais (HIP, CPF e CE) para a realização dos homogenatos e quantificação das citocinas, por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante e os resultados expressos em pg/g de tecido.

Os homogenatos foram preparados homogeneizando as áreas cerebrais, separadamente, em 8 volumes de tampão PBS com protease (EMD Biosciences) e fosfatase (Sigma-Aldrich), e centrifugando a 10000 rpm/5 minutos, utilizando o sobrenadante para a realização do teste.

## 4.7. Estudo computacional

### 4.7.1. Previsão de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)

As propriedades ADME da molécula em estudo foram previstas e avaliadas por meio do servidor SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; WATERHOUSE *et al.*, 2018). Esse servidor foi utilizado para prever as propriedades físico-químicas, farmacocinética (absorção gastrointestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica, inibição de CYPs, permeabilidade da pele) e propriedades de “drogabilidade” - *drugability* (regra Lipinski).

### 4.7.2. Modelagem Molecular

Para prever o modo de ligação e a afinidade da molécula em estudo com os alvos de interesse farmacológico, foi realizado ensaios de *docking* molecular, usando o programa Glide (Schrödinger, USA), no modo de precisão extra (XP) (FRIESNER *et al.*, 2006; SHELLEY *et al.*, 2007). As estruturas cristalográficas das proteínas foram coletadas do *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000) e, quando não disponíveis, construídas utilizando modelos de homologia tridimensionais pelo servidor SWISS-MODEL (BERTONI *et al.*, 2017; BIENERT *et al.*, 2017; WATERHOUSE *et al.*, 2018). Nesses casos, os modelos foram posteriormente refinados pelo servidor *3Drefine-protein structure refinement server* (BHATTACHARYA *et al.*, 2016) e tiveram seus sítios de ligação preditos pelo servidor *Pock-Drug- Pocket Druggability Prediction* (HUSSEIN *et al.*, 2015). Essas estruturas (estruturas cristalográficas e modelos) foram preparados no módulo Assistente de Preparação de Proteína

do Glide, no qual foram adicionados átomos de hidrogênio. Os ligantes foram preparados no módulo LigPrep. Os estados de protonação, das proteínas e dos ligantes, foram calculados de acordo com Epik (pH 7,4 + 0,5) (GREENWOOD *et al.*, 2010; SHELLEY *et al.*, 2007) e energia interna minimizada usando o campo de força OPLS-200517. Após os cálculos de *docking*, foram inspecionadas as posições de encaixe considerando as interações intra e intermoleculares estabelecidas, bem como os escores de docking de cada binário proteína-ligante.

Os ligantes escolhidos foram os transportadores de serotonina e dopamina, receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, D1, D2,  $\alpha$ -2 e GABA<sub>A</sub>, as enzimas MAO-A e MAO-B.

#### 4.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism (versão 6.01). Inicialmente, os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra (paramétrico ou não paramétrico). Para a comparação entre duas variáveis não paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para os testes com mais de três grupos, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey (*post hoc*), para resultados paramétricos, ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn's (*post hoc*), para os não paramétricos. Os valores utilizados para a elaboração da curva dose-resposta foram determinados por regressão não-linear [equação  $\log(\text{agonista})$  vs resposta].

Em todas as análises estatísticas, os valores foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) com valores significativos quando  $p < 0,05$ .

## **5. CAPÍTULO 1**

## 5.1. ARTIGO DERIVADO DA TESE

**REVISTA:** European Journal of Pharmacology

### **ANTIDEPRESSANT AND ANXIOLYTIC POTENTIAL OF RIPARIN IV IN MICE: PHARMACOLOGICAL, NEUROCHEMICAL AND COMPUTATIONAL EVIDENCES**

- Natália Ferreira de Oliveira<sup>1</sup>
- Danusio Pinheiro Sartori<sup>1</sup>
- José Tiago Valentim<sup>1</sup>
- Daniel Moreira Alves da Silva<sup>1</sup>
- Auriana Serra Vasconcelos<sup>1</sup>
- Iris Cristina Maia Oliveira<sup>1</sup>
- Raquell de Castro Chaves<sup>1</sup>
- Victor Celso Cavalcanti Capibaribe<sup>1</sup>
- Alyne Mara Rodrigues de Carvalho<sup>1</sup>
- Manoela de Oliveira Rebouças<sup>1</sup>
- Adriano José Maia Chaves Filho<sup>1</sup>
- Stanley Juan Chavez Gutierrez<sup>3</sup>
- José Maria Barbosa-Filho<sup>4</sup>
- Marta Maria de França Fonteles<sup>2</sup>
- Danielle Macêdo<sup>1</sup>
- Francisca Cléa Florenço de Sousa<sup>1</sup>

1 - Drug Research and Development Center, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

2 – Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Odontology and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

3 – Laboratory Chemistry of Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

4 – Pharmaceutical Technology Laboratory, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Correspondence to: Francisca Cléa Florenço de Sousa. Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará; Rua Coronel Nunes de Melo, nº 1000. Fortaleza-CE, 60430-275 Brasil; Tel. (85) 3366-8337. Email: [cleaflorenco@yahoo.com.br](mailto:cleaflorenco@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

Depression and anxiety are the most frequently occurring psychiatric disorders. Depression is a public health concern, resulting in negative effects on society and public systems. Theories on pathophysiology of depression are based on studies investigating psychosocial stress and related hormones, neurotransmitters, neurocircuits, neurotrophic factors, circadian rhythms, and the immune system. This study investigated the antidepressant and anxiolytic effects of riparin IV in mice. Behavioral tests, such as forced swimming test and tail suspension test, were performed to investigate the antidepressant-like effects and the elevated plus maze and hole-board test were used to investigate anxiolytic-like effects. The effects of riparin IV on neurochemicals tests such as monoamines and their metabolites, on cytokines and oxidative stress in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum were evaluated. In addition, a computational prediction test was performed. Our results showed that riparin IV produced antidepressant-like and anxiolytic-like behavioral effects without modifying locomotor activity and motor coordination. Riparin IV increased monoamine and monoamine metabolite levels in the central nervous system of mice. In addition, riparin IV impacted the noradrenergic, dopaminergic, serotonergic, and GABAergic systems and exerted a protective effect against lipid peroxidation in the hippocampus, as determined by TBARS, nitrite/nitrate, GSH, SOD, and CAT assays, suggesting neuroprotective effects. Computationally, riparin IV has been shown to cross the blood-brain barrier, to have high gastrointestinal absorption and to have affinity to interact with the MAO-B and D2 receptors and serotonin and dopamine transporters, and may be a promising substance for the treatment of depression and associated depression anxiety.

**Keywords:** Riparin, Depression, Biogenic Monoamines, Oxidative Stress, Neuroinflammation.

## 1. INTRODUCTION

Depression and anxiety are the most frequently occurring psychiatric disorders in society. Data from the World Health Organization show that depression is the major cause of disability worldwide (WHO, 2017) and is considered a public health problem, resulting in negative impacts on society and public systems (Oliveira *et al.*, 2017).

Characteristics of depression include mood change, sometimes with associated cognitive, psychomotor, or vegetative alterations. Anxiety is related to fear, and is characterized by behavioral disturbances in response to expected threat (Souza, 2017). Depression and anxiety may appear to be interrelated despite being classified as distinct disorders (Goodwin, 2015).

Current theories of pathophysiology of depression are based on studies investigating psychosocial stress and related hormones, neurotransmitters (serotonin, noradrenaline, dopamine, glutamate and GABA), neurocircuits, neurotrophic factors, circadian rhythm, and the immune system (Souza, 2017; Vismari *et al.*, 2008).

Several medicines are available to treat these two pathologies. However, current drugs induce adverse effects, have high latency to therapeutic effects, and are often expensive. These issues highlight the need to develop new drugs to overcome these challenges (OPAS/OMS, 2018).

The aim of this study was to investigate the antidepressant and anxiolytic effects of riparin IV, a synthetic alkaloid analogue to *Aniba riparia*'s natural compounds (Barbosa-Filho *et al.*, 1990). Riparin IV has a similar molecular structure to tyramine, a catecholamine releasing agent, which can indicate in potential central activity (figure 1).

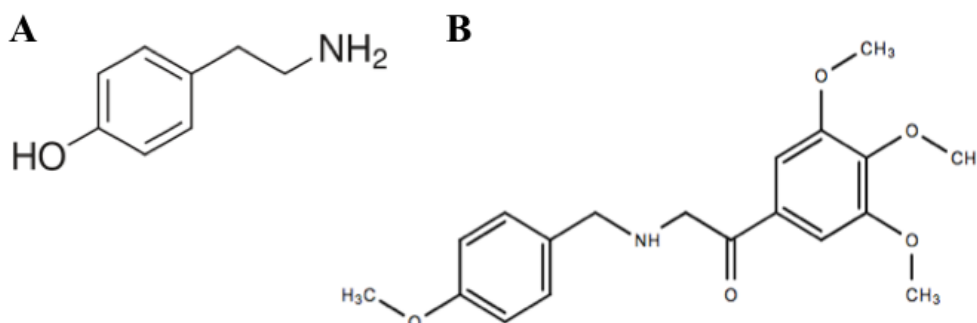


Figure 1 – (A) Molecular structure of tyramine and (B) molecular structure of riparin IV (Nascimento *et al.*, 2016; Sigma-Aldrich, 2018).

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Drugs

Bupropion (30 mg/kg; Nova Química Brasil®) (Teixeira *et al.*, 2013), imipramine (10 or 30 mg/kg; EMS Brasil®) (Citó *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2013), and fluoxetine (35 mg/kg; Sandoz Brasil®) (Citó *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2013), all delivered by gavage (p.o.), were used as reference standards for evaluation of antidepressant activity. SCH23390 (15 µg/kg; D1 antagonist; Sigma-Aldrich Brasil Ltda®) (Teixeira *et al.*, 2013) and sulpiride (50 mg/kg; D2 antagonist; Sigma-Aldrich Brasil Ltda®) (Citó *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2013) were used for dopaminergic receptor antagonism. Ritanserin (4 mg/kg; 5-HT<sub>2A/2C</sub> antagonist; Sigma-Aldrich Brasil Ltda®) (Teixeira *et al.*, 2013), and ondansetron (0.1 mg/kg; 5-HT<sub>3</sub> antagonist; Sigma-Aldrich Brasil Ltda®) (Melo, 2013) were used for serotonergic receptor antagonism. Prazosin (62.5 mg/kg; α<sub>1</sub> antagonist; Sigma-Aldrich Brasil Ltda®) (Binfaré, 2009) and yohimbine (1 mg/kg; α<sub>2</sub> antagonist; Sigma-Aldrich Brasil Ltda®) (Binfaré, 2009; Citó *et al.*, 2014) were used for noradrenergic receptor antagonism. All antagonists were administered intraperitoneally.

Diazepam at doses of 1 or 2 mg/kg (União Química Brasil®) (Chaves *et al.*, 2018), per gavage (p.o.), was used as a reference standard for evaluation of anxiolytic effects, and intraperitoneal flumazenil (2.5 mg/kg; Sigma-Aldrich Brasil Ltda®) (Chaves *et al.*, 2018), was used as a GABAergic antagonist.

Riparin IV (N-[8'-(4'-methoxyphenylethyl)]-3,4,5-trimethoxybenzoylamide) was synthesized by Barbosa Filho *et al.*, 1990 at the Laboratory of Pharmaceutical Technology of the Federal University of Paraíba-Brazil.

All drugs were dissolved in distilled water with 3% Tween®-80 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Animals in the vehicle group received distilled water and 3% Tween®-80.

### 2.2. Animals

Male Swiss adult albino (*Mus musculus*) mice weighing between 20 g and 30 g, obtained from the vivarium of the Federal University of Ceará (UFC), were kept at a controlled temperature (23 ± 1 °C) under light/dark cycles of 12/12 hours with free access to water and food. They were randomly distributed into specific experimental groups. Before testing, the mice were transported to the experiment room and allowed to acclimatize for at least one hour.



All procedures were performed according to the recommendations of the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Experimental protocols were approved by the Animal Research Ethics Committee of the UFC (68/2014 and 72/2017).

### **2.3. Dose-response curve**

A dose-response curve was generated using results from the forced swimming test (FST) (Porsolt *et al.*, 1977). Mice were treated with riparin IV (5, 10, 12.5, 25, 50, 100, and 200 mg/kg, p.o.) (8 animals/group) 60 minutes before the test. The time animals remained immobile was used to determine the drug dose that induced half-maximal effect (EC50). This result contributed to the administration of the doses used in the other tests.

### **2.4. Forced Swimming Test (FST)**

The FST, proposed by Porsolt *et al.* (1977), has been used as a predictive model of antidepressant effects. Mice were divided into 6 groups (8 animals/group) and treated p.o. with vehicle, riparin IV (50 or 100 mg/kg), fluoxetine, bupropion, or imipramine (10 mg/kg) (Citó *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2015). Sixty minutes after drug administration, the animals were placed, one at a time, in the tank, and immobility time, in seconds, was recorded for 5 minutes. The mice were considered immobile when they remained floating in the water making only slight movements to keep their heads above water.

### **2.5. Tail Suspension Test (TST)**

The TST, proposed by Steru *et al.* (1985), is useful for screening of antidepressant drugs. Immobility time was measured for 6 minutes. Mice were divided into 6 groups (8 animals / group): vehicle, riparin IV (50 or 100 mg/kg), fluoxetine, bupropion, or imipramine (30 mg/kg) (Teixeira *et al.*, 2013) administered orally (gavage).

### **2.6. Elevated Plus Maze Test (EPM)**

For EPM, proposed by Lister (1987), mice were divided into 4 groups (8 animals/group) and treated with vehicle, riparin IV (50 or 100 mg/kg) or diazepam (1 mg/kg, p.o.). After 60 minutes, mice were placed in the center with their head toward one of the closed arms. For 5 minutes, the number of entrances and the time spent in the open and closed arms were observed. For statistical analysis, only the parameters related to the open arms were considered.

### **2.7. Hole-Board Test (HBT)**

The HBT is based on the concept that rodent exploratory activity is inversely proportional to anxiety level (File and Wardill, 1975). Mice were divided into 4 groups (8 animals/group) and treated with vehicle, riparin IV (50 or 100 mg/kg, p.o.), or diazepam (1 mg/kg,

p.o.) (Chaves *et al.*, 2018; Doukkali *et al.*, 2015; Moniruzzaman *et al.*, 2015). After 60 min, mice were placed in the apparatus. The test proposed by Clark *et al.* (1971) instructs to count the number of dips into the holes of the plate for 5 minutes.

### **2.8. Open Field Test (OFT)**

The OFT was used to evaluate spontaneous locomotor activity. Mice were divided into 4 groups (8 animals/group) and treated with vehicle, riparin IV (50 or 100 mg/kg) or diazepam (2 mg/kg) (Chaves *et al.*, 2018). Mice were placed in the center of the open field where the number of crossings were observed for 5 minutes, based on the model described by Archer (1973).

### **2.9. Rotarod Test (RRT)**

The RRT measures muscle relaxation or lack of motor coordination in response to drug administration (Carlini and Burgos, 1979). Mice were divided into 4 groups (8 animals/group) and treated with vehicle, riparin IV (50 or 100 mg/kg), or diazepam (2 mg/kg) (Chaves *et al.*, 2018). Mice were placed with all four legs on a 2.5 cm diameter bar raised 25 cm from the floor which rotated at 12 rpm for a period of 1 minute. Permanence time on the rotating bar was recorded in seconds(s) (Dunham and Miya, 1957).

### **2.10. Determination of monoamines levels**

Monoamine levels were measured by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) in homogenates prepared from the hippocampus, prefrontal cortex, and striatum of groups pretreated with vehicle or riparin IV (50 or 100 mg/kg, p.o.) (8 animals/group) and subjected to the FST. Animals were sacrificed by decapitation.

### **2.11. Noradrenergic System**

Mice were pretreated i.p. with prazosin or yohimbine. After 30 minutes vehicle, riparin IV (50 mg/kg), or imipramine (10 mg/kg) were administered p.o. After 60 minutes, the animals were subjected to the FST and immobility time was evaluated for 5 minutes.

### **2.12. Dopaminergic System**

Mice were pretreated with SCH23390 or sulpiride i.p. After 30 minutes vehicle, riparin IV (50 mg/kg), or bupropion were administered p.o. After 60 minutes, the animals were subjected to the FST and immobility time was measured for 5 minutes.

### **2.13. Serotonergic System**

Mice were pretreated i.p. with ritanserin or ondansetron. After 30 minutes they received vehicle, riparin IV (50 mg/kg), or fluoxetine p.o. After 60 minutes, the animals were subjected to the FST and immobility time was evaluated for 5 minutes.

### **2.14. GABAergic System**

To investigate possible involvement of the GABA<sub>A</sub> receptor in the anxiolytic effect of riparin IV, three groups, each containing 8 animals, were pretreated with flumazenil i.p. 15 minutes before receiving the following p.o.: vehicle (group 1), riparin IV (50 mg/kg) (group 2), and diazepam (1 mg/kg) (group 3) (Chaves *et al.*, 2018). After 60 minutes, mice were subjected to the EPM test.

### **2.15. Oxidative stress**

Investigation of antioxidant effects of riparin IV was performed in hippocampus, prefrontal cortex, and striatum homogenates from animals pretreated with vehicle, riparin IV (50 or 100 mg/kg, p.o.) (8 animals/group). Mice were subjected to the FST then decapitated for brain dissection.

#### **2.15.1. Determination of production of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)**

Degree of lipoperoxidation was measured using the TBARS assay, according to the method of Draper and Hadley (1990). TBARS content was determined using a spectrophotometer at 535 nm. Results were expressed as micrograms of malondialdehyde (MDA) per gram of tissue.

#### **2.15.2. Determination of nitrite/nitrate production**

Nitric oxide (NO) production was determined using the method proposed by Green *et al.* (1982). Absorbance was measured using a spectrophotometer at 546 nm. Nitrite/nitrate concentration was expressed in nmol/g tissue.

#### **2.15.3. Determination of reduced glutathione (GSH) concentration**

Determination of GSH was based on the method described by Sedlak and Lindsay (1968). Absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm and results were expressed as µg of GSH per g tissue.

#### **2.15.4. Determination of the enzymatic activity of catalase (CAT)**

According to Chance and Maehly (1955), CAT activity measurement is based on the rate of production of O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzymatic activity was determined by absorbance change per minute for 6 minutes. Results were expressed in U/mg protein. Analysis was performed in a quartz cuvette in a spectrophotometer at 230 nm. Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976).

#### **2.15.5. Determination of Superoxide Dismutase Activity (SOD)**

In the method described by Beauchamp and Fridovich (1971), the amount of SOD is assessed by measuring its ability to inhibit photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). Measurement was performed after exposure of the material to fluorescent light for 15 min in a spectrophotometer at 560 nm. Enzymatic activity was expressed in U/mg protein.

#### **2.16. Dosage of IL-6 and TNF $\alpha$ Cytokines**

The animals were divided in riparin IV 50mg/kg (v.o.) or vehicle (v.o.) groups and subjected to the forced swimming test. The animals were then euthanized, the brain areas (hippocampus, prefrontal cortex, and striatum) were removed for homogenates and cytokine quantification by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol and the results expressed in pg/g of tissue.

#### **2.17. *In silico* study**

The ADME properties of the molecule under study were predicted and evaluated through the SwissADME server (Daina *et al.*, 2017). To predict the binding mode and affinity of the molecule under study with the targets of pharmacological interest, molecular docking assays were performed using the Glide program (Schrödinger, USA) in the extra precision mode (XP) (Friesner *et al.*, 2006). The protein crystallographic structures were collected from the Protein Data Bank (PDB) (Guex *et al.*, 2009) and, when not available, constructed using three-dimensional homology models by the SWISS-MODEL server (Bienert *et al.*, 2017).

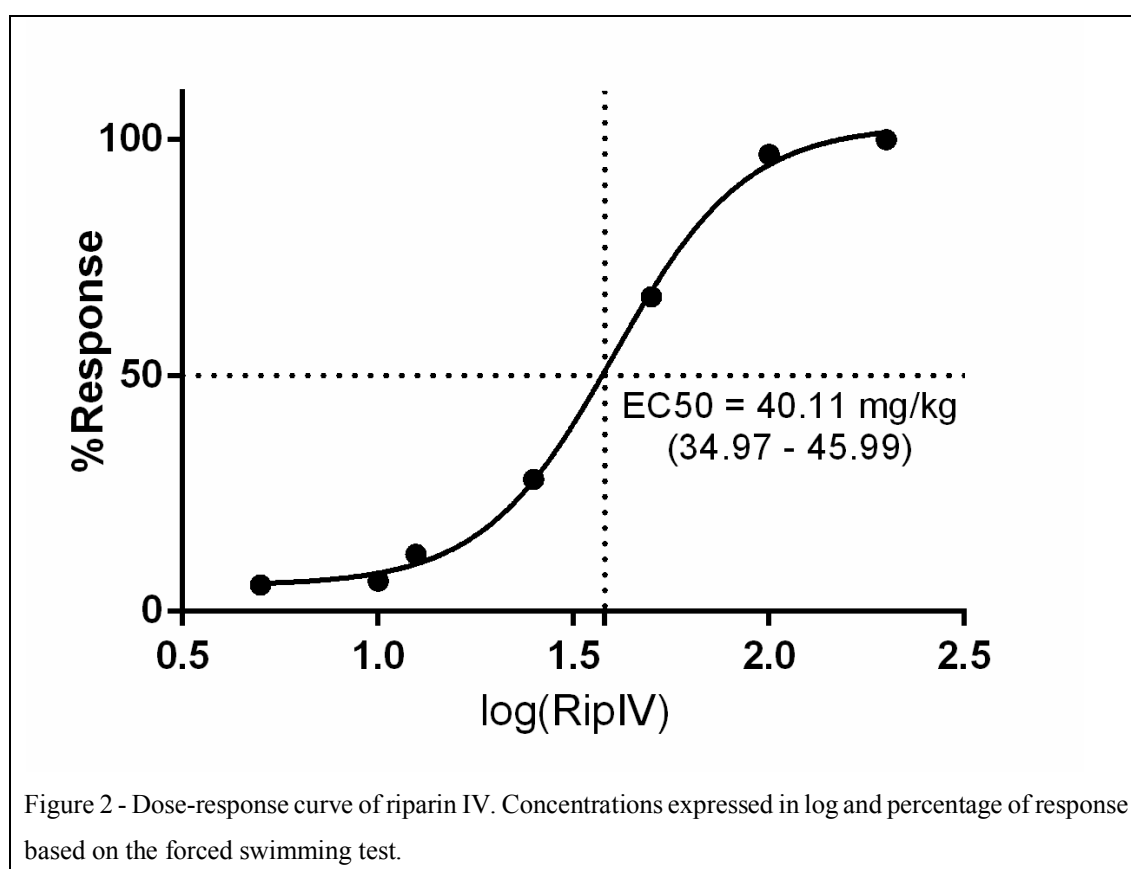
#### **2.18. Statistical analysis**

Data were analyzed using GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad software, San Diego, CA, USA) and results are shown as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical differences between groups were analyzed by Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and *post-hoc* analysis was performed using Dunn's or one-way ANOVA using Tukey's test. P-values less than 0.05 were considered significant. The dose-response curve was generated using non-linear regression [log (agonist) vs. response equation].

### 3. RESULTS

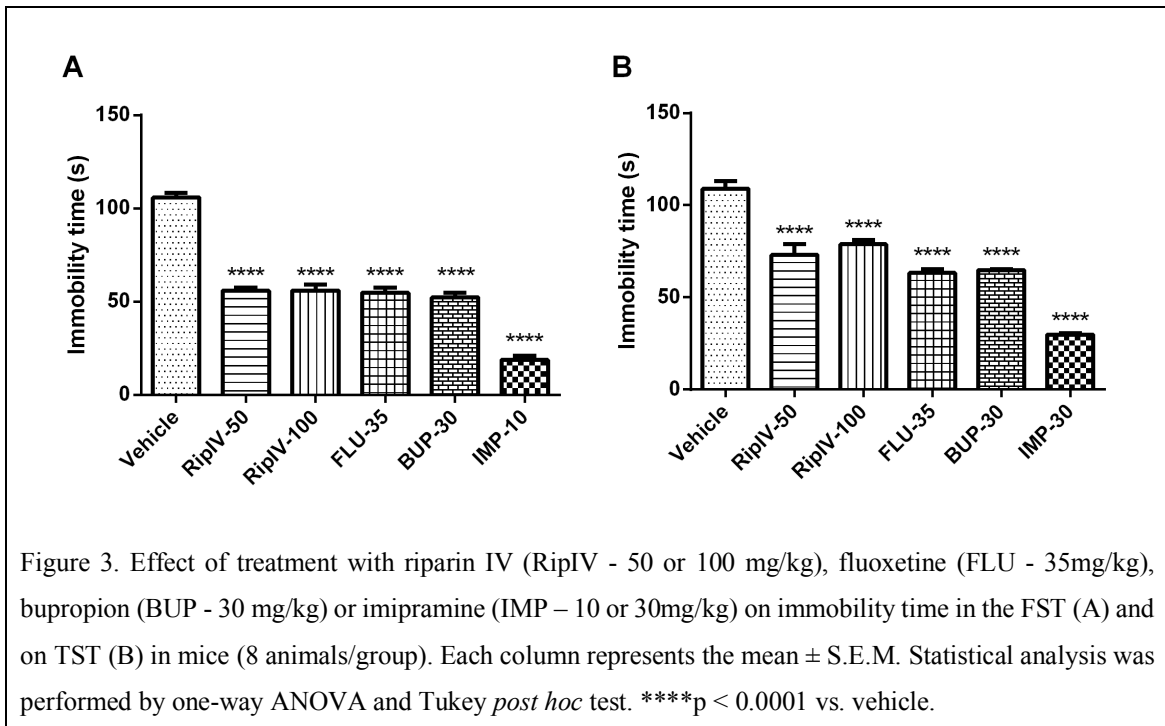
#### 3.1. Dose-response curve

The dose-response curve was generated using FST results. The dependent variable was immobility time of the animals across a 5-minute analysis period. According to Figure 2, the EC50 was 40.11 (34.97 to 45.99) mg/kg. This result contributed to the decision to use 50 and 100 mg/kg doses for all other tests.

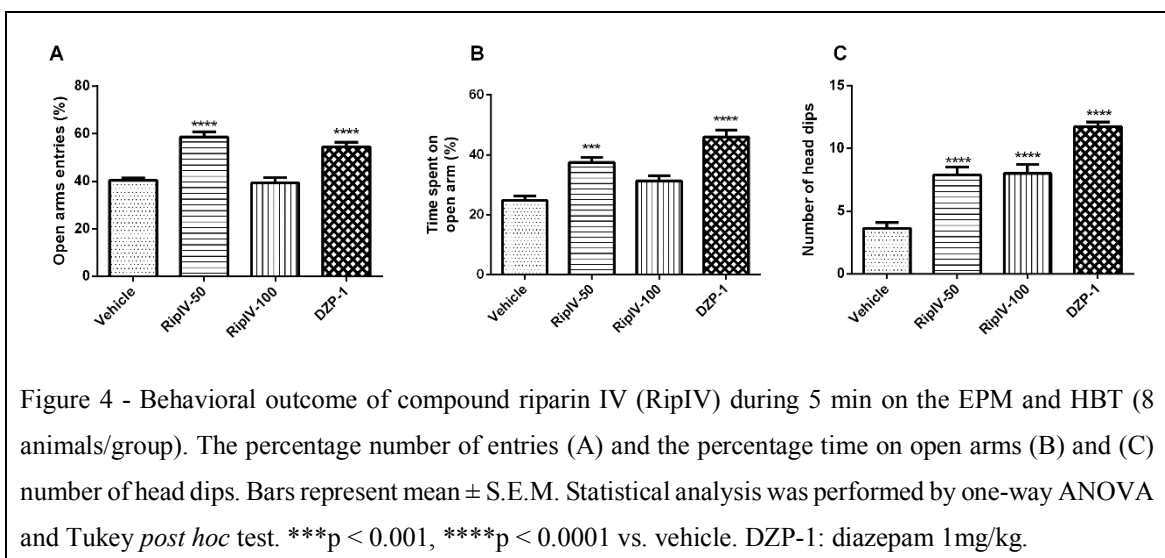


#### 3.2. Riparin IV demonstrated antidepressant-like and anxiolytic-like behavioral effects without modification of locomotor activity and motor coordination.

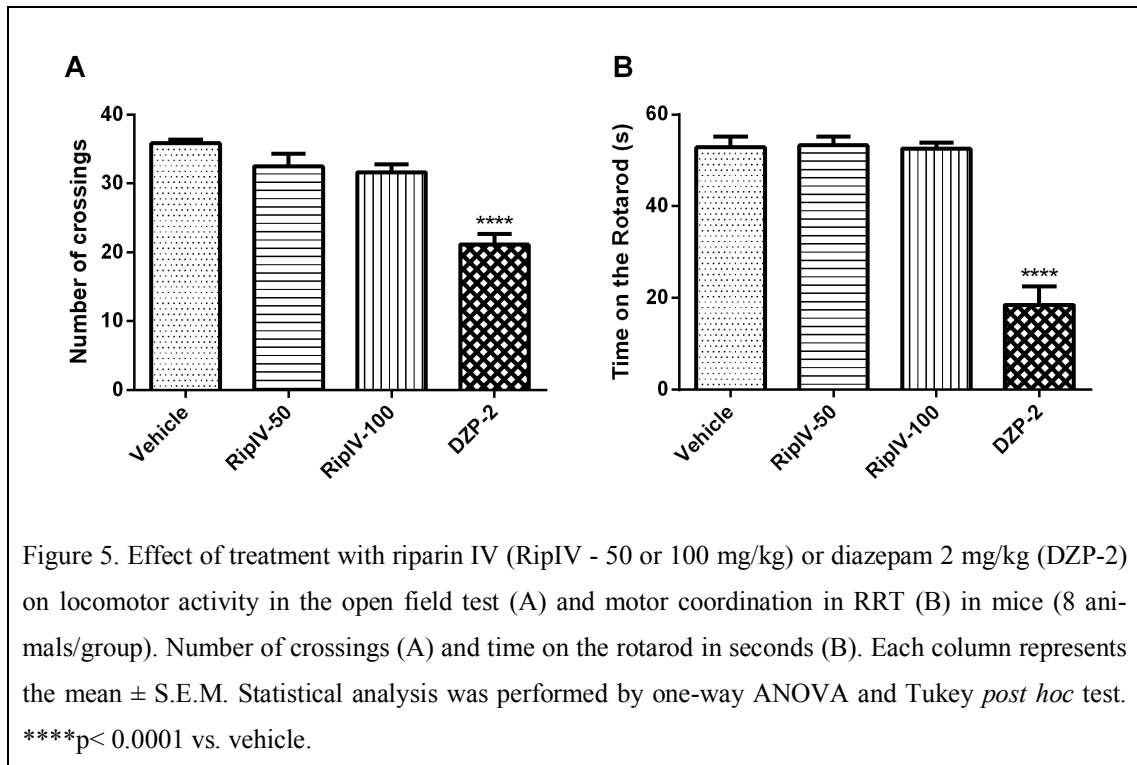
The effects of riparin IV on immobility time of mice in the FST and TST were evaluated. Riparin IV at doses of 50 and 100 mg/kg, significantly decreased immobility time of mice in both tests compared to that of vehicle [FST:  $F(5, 42) = 122.9$ ,  $P < 0.0001$ ; TST:  $F(5, 42) = 62.15$ ,  $P < 0.0001$ ] (Figure 3).



To evaluate anxiolytic-like activity, EPM and HBT were used. In the EPM test, riparin IV at a dose of 50 mg/kg and diazepam resulted in significantly increased percentage of entries ( $F(3, 28) = 26.25, P < 0.0001$ ) and time spent in the open arms ( $F(3, 28) = 23.78, P < 0.0001$ ) (Figure 4A and 4B) compared to vehicle. In the HBT (Figure 4C), after acute administration of riparin IV at doses of 50 and 100 mg/kg, a significant increase in head dips was observed when compared to vehicle ( $F(3, 28) = 33.26, P < 0.0001$ ).



Spontaneous locomotor activity and motor coordination were evaluated using the OFT and rotarod, respectively. The results showed that riparin IV had no significant effect on spontaneous locomotor activity (Figure 5A) and did not alter motor coordination (Figure 5B). Diazepam, used as a reference standard, had a significant effect on spontaneous locomotor activity ( $F(3, 28) = 21.89, P < 0.0001$ ) and motor coordination ( $F(3, 28) = 42.64, P < 0.0001$ ) (Figure 5).



### 3.3. Riparin IV increased levels of monoamines and their metabolites in the hippocampus, prefrontal cortex, and striatum of mice.

Table 1 shows the effects of riparin IV after the FST on levels of noradrenaline, dopamine, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), serotonin, and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum hippocampus of mice. Riparin IV, at a dose of 50 mg/kg, increased levels of noradrenaline (1523% in the hippocampus, 1317% in the prefrontal cortex and 1169% in the striatum), dopamine (218% in the hippocampus, 3942% in the prefrontal cortex and 252% in the striatum), 5-HIAA (338% in the hippocampus, 290% in the prefrontal cortex and 697% in the striatum), and DOPAC (92% in the prefrontal cortex and 178% in the striatum). In addition, riparin IV at a dose of 100 mg/kg significantly increased serotonin in the three areas studied (1484% in the hippocampus, 345% in the prefrontal cortex and 2288% in the striatum), increased noradrenaline (590%) in the

prefrontal cortex, DOPAC in the hippocampus (218%) and prefrontal cortex (152%), and increased dopamine in the striatum (379%).

Table 1 - Monoamines levels and their metabolites in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum of mice.

Region	Monoamine/ Metabolite	Vehicle	Riparin IV 50 mg/kg	Riparin IV 100 mg/kg
Hippocampus	Noradrenaline	472.2 ± 6.033	7662 ± 1197****	2894 ± 219.6
	Dopamine	72.65 ± 3.713	230.7 ± 27.65****	48.25 ± 2.469
	DOPAC	90.48 ± 14.35	130.3 ± 25.03	287.7 ± 47.44***
	Serotonin	210.1 ± 49.93	358.4 ± 56.72	3328 ± 400****
	5-HIAA	108.2 ± 16.83	474.3 ± 19.52****	131.4 ± 10.5
Prefrontal cortex	Noradrenaline	425 ± 5.398	6023 ± 378.7****	2934 ± 233.9****
	Dopamine	70.64 ± 3.435	2855 ± 135.3****	125.1 ± 32.35
	DOPAC	227.9 ± 35.52	436.6 ± 25.23*	573.2 ± 73.36***
	Serotonin	210.5 ± 38.48	319.8 ± 10.38	935.9 ± 75.22****
	5-HIAA	76.45 ± 21.93	298.3 ± 7.289****	101.6 ± 12.49
Striatum	Noradrenaline	449 ± 2.321	5698 ± 437.8****	1233 ± 69.15
	Dopamine	151.7 ± 7.417	533.8 ± 64.51***	726.6 ± 67.45****
	DOPAC	216.2 ± 22.33	600.4 ± 79.63***	176.4 ± 52.95
	Serotonin	187.8 ± 24.43	172.2 ± 31.1	4485 ± 169.6****
	5-HIAA	64.91 ± 19.17	517.4 ± 76.11****	83.5 ± 19.87

Results ( $\mu\text{g/g}$  tissue) are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8$  animals/group). Statistical analysis was determined by regular one-way ANOVA, followed by Tukey *post hoc* test. Significant values: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. vehicle. DOPAC: dihydroxyphenylacetic acid, 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid.

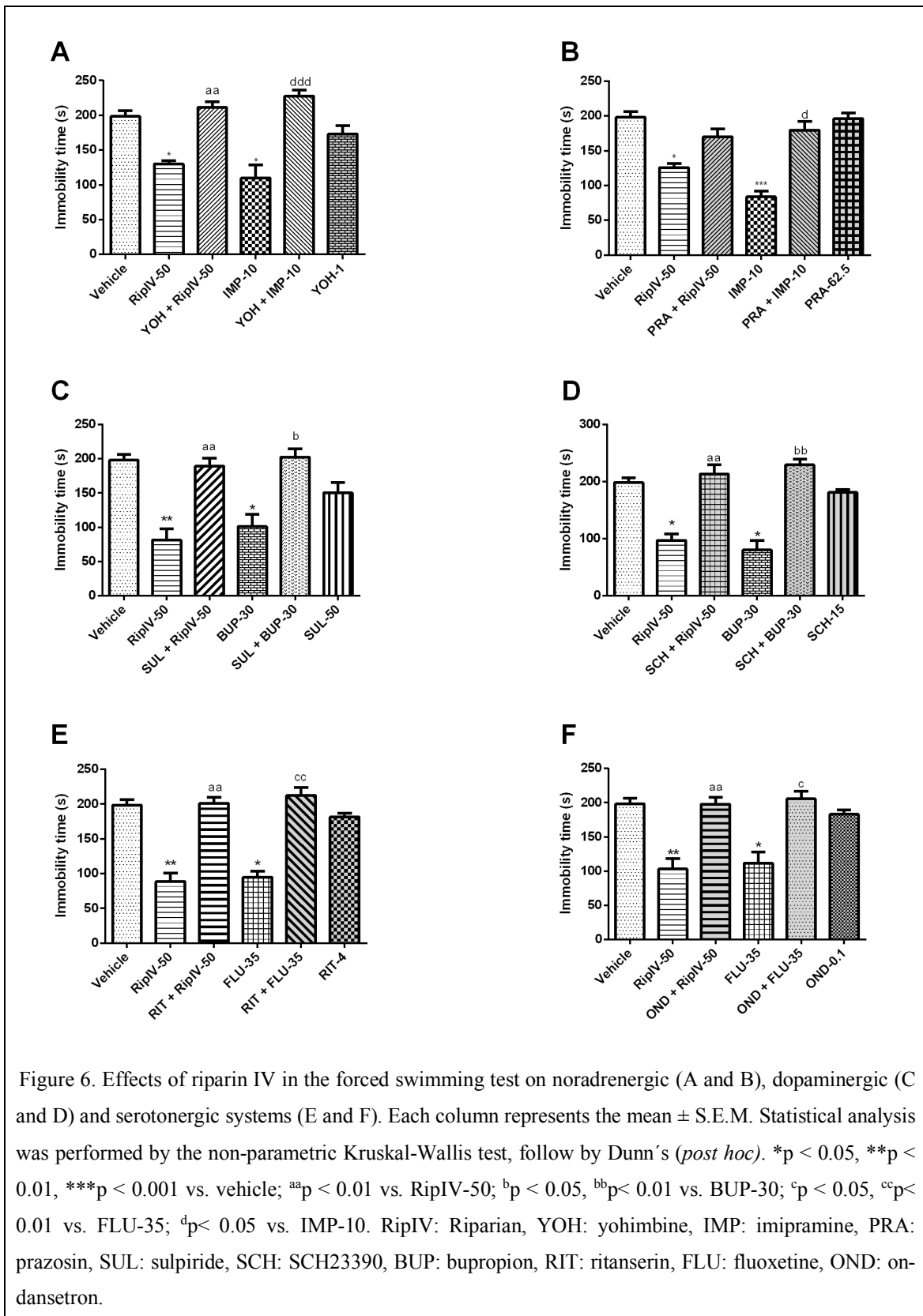
### 3.4. Involvement of riparin IV in noradrenergic, dopaminergic, serotonergic, and GABAergic systems.

To evaluate receptor antagonists, mice were subjected to the FST following combined administration of the test drug and specific receptor antagonists.

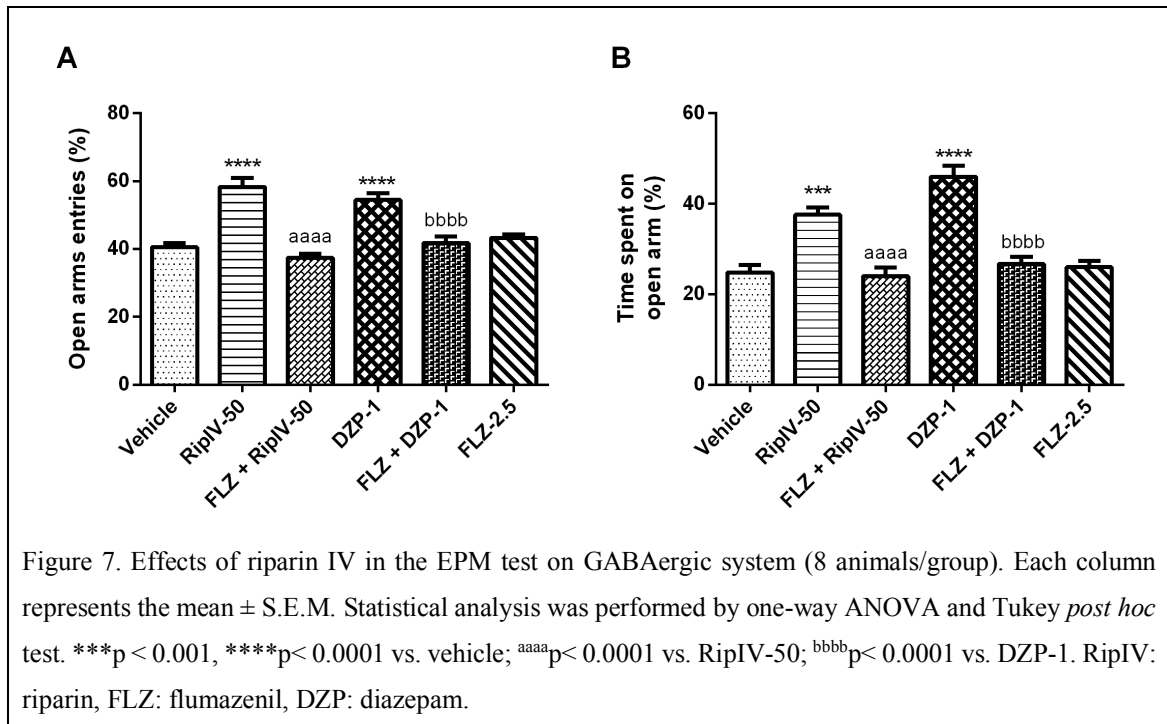
Our results demonstrated that riparin IV treatment (50 mg/kg; RipIV-50) resulted in shorter immobility time when compared to that of the vehicle group. This effect was not observed in the yohimbine (YOH) + RipIV-50 group. We also observed a significant difference between the RipIV-50 *versus* the YOH + RipIV-50 groups (vehicle:  $198.4 \pm 7.919$ ; RipIV-50:  $130.0 \pm 4.563$ ; YOH + RipIV-50:  $211.1 \pm 8.574$ ) (Figure 6A). In addition, there was no significant difference between the RipIV-50 and prazosin (PRA) + RipIV-50 groups (vehicle:  $198.4 \pm 7.919$ ; RipIV-50:  $126.0 \pm 5.322$ ; PRA + RipIV-50:  $169.9 \pm 11.7$ ) (Figure 6B).



Similar patterns were observed with other antagonists (Figure 6C – 6F). In general, immobility time in the riparin IV group were lower than that in the vehicle group and that in the antagonist groups. The results of tests using antagonists were as follows: SCH23390 (vehicle:  $198.4 \pm 7.919$ ; RipIV-50:  $96.75 \pm 11.31$ ; SCH23390 + RipIV-50:  $212.8 \pm 16.77$ ), sulpiride (vehicle:  $198.4 \pm 7.919$ ; RipIV-50:  $81.38 \pm 16.61$ ; sulpiride + RipIV-50:  $189.3 \pm 11.96$ ), ritanserin (vehicle:  $198.4 \pm 7.919$ ; RipIV-50:  $88.38 \pm 12.21$ ; ritanserin + RipIV-50:  $201.4 \pm 8.422$ ), and ondansetron (vehicle:  $198.4 \pm 7.919$ ; RipIV-50:  $103.0 \pm 15.31$ ; ondansetron + RipIV-50:  $198.0 \pm 9.813$ ).

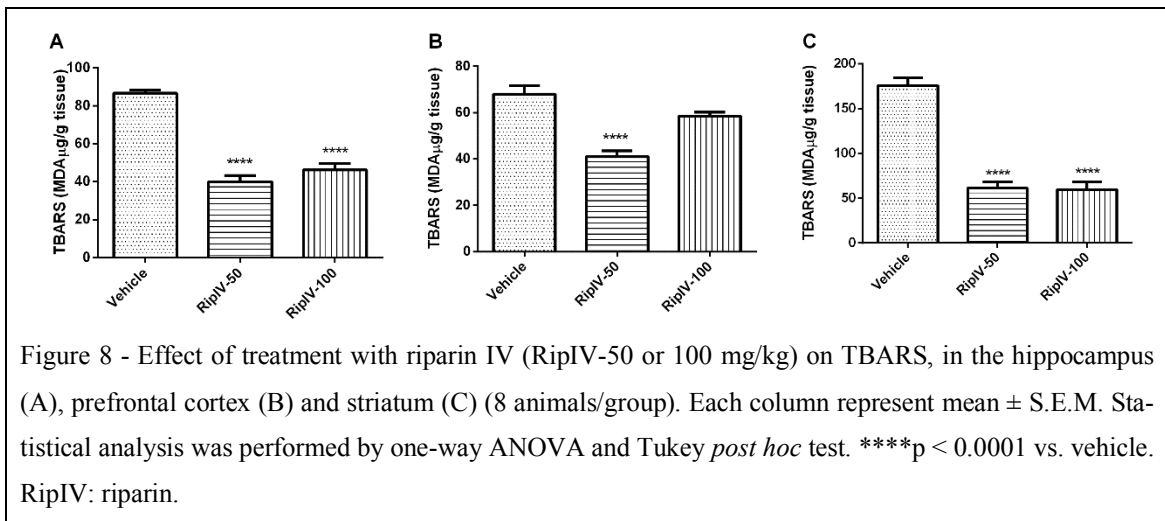


For evaluation of the GABAergic system, mice were subjected to the EPM test, and flumazenil was used as an antagonist. The results demonstrated a decrease in percentage of entries (RipIV-50:  $58.31 \pm 2.580$ ; FLZ+RipIV-50:  $37.41 \pm 1.142$ ) ( $F(5, 42) = 23.79$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 7A) and in the time spent (RipIV-50:  $37.58 \pm 1.590$ ; FLZ+RipIV-50:  $24.03 \pm 1.831$ ) ( $F(5, 42) = 25.53$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 7B) in the open arms in the FLZ+RipIV-50 versus the RipIV-50 group.



### 3.5. Involvement of oxidative stress and proinflammatory cytokines in the effects of riparin IV.

Administration of riparin IV (50 mg/kg) resulted in significantly decreased MDA levels in the hippocampus (vehicle:  $86.72 \pm 1.774$ , RipIV-50:  $40.16 \pm 3.103$ ), the prefrontal cortex (vehicle:  $67.98 \pm 3.730$ , RipIV-50:  $41.02 \pm 2.508$ ), and the striatum (vehicle:  $175.7 \pm 8.537$ , RipIV-50:  $61.39 \pm 6.994$ ), and 100 mg/kg riparin IV induced a significant decreases in the hippocampus (vehicle:  $86.72 \pm 1.774$ , RipIV-100:  $46.28 \pm 3.243$ ) and the striatum (vehicle:  $175.7 \pm 8.537$ , RipIV-100:  $59.41 \pm 9.018$ ) (hippocampus:  $F(2, 21) = 82.47$ ,  $P < 0.0001$ ; prefrontal cortex:  $F(2, 21) = 24.78$ ,  $P < 0.0001$ ; striatum:  $F(2, 21) = 65.51$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figure 8).



Riparin IV inhibited nitrite/nitrate formation in the hippocampus (vehicle:  $11.47 \pm 0.1952$ , RipIV-50:  $2.231 \pm 0.1300$ , RipIV-100:  $2.473 \pm 0.05136$ ) (Figure 9A) and the prefrontal cortex (vehicle:  $5.477 \pm 0.2148$ , RipIV-50:  $2.374 \pm 0.2318$ , RipIV-100:  $1.631 \pm 0.2317$ ) (Figure 9B) (hippocampus:  $F(2, 21) = 1442$ ,  $P < 0.0001$ ; prefrontal cortex:  $F(2, 21) = 81.30$ ,  $P < 0.0001$ ; striatum:  $F(2, 21) = 2.344$ ,  $P = 0.1206$ ) at both doses.

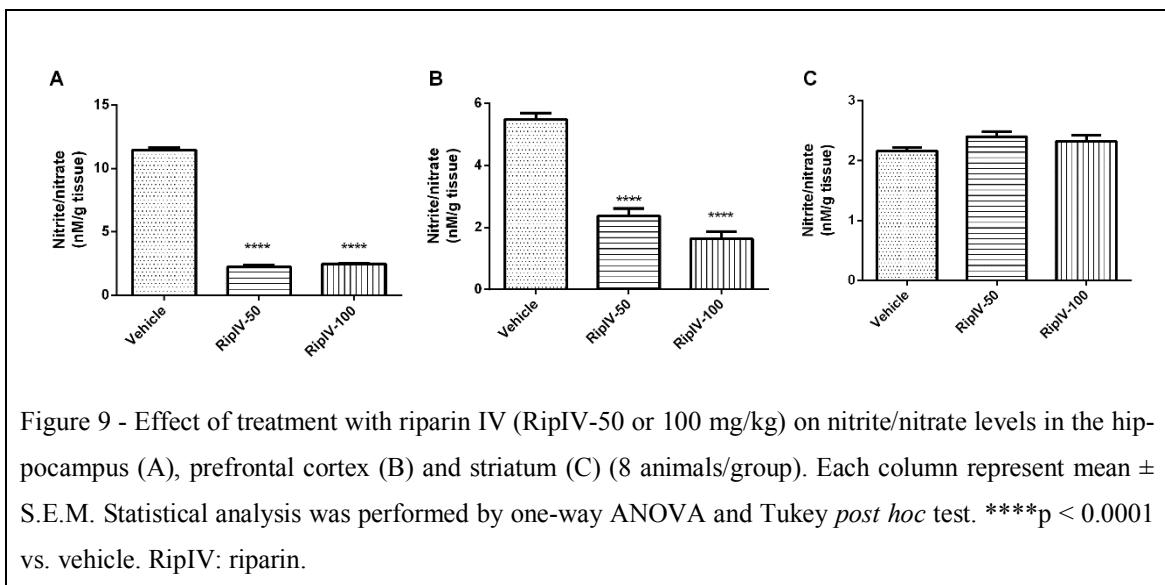
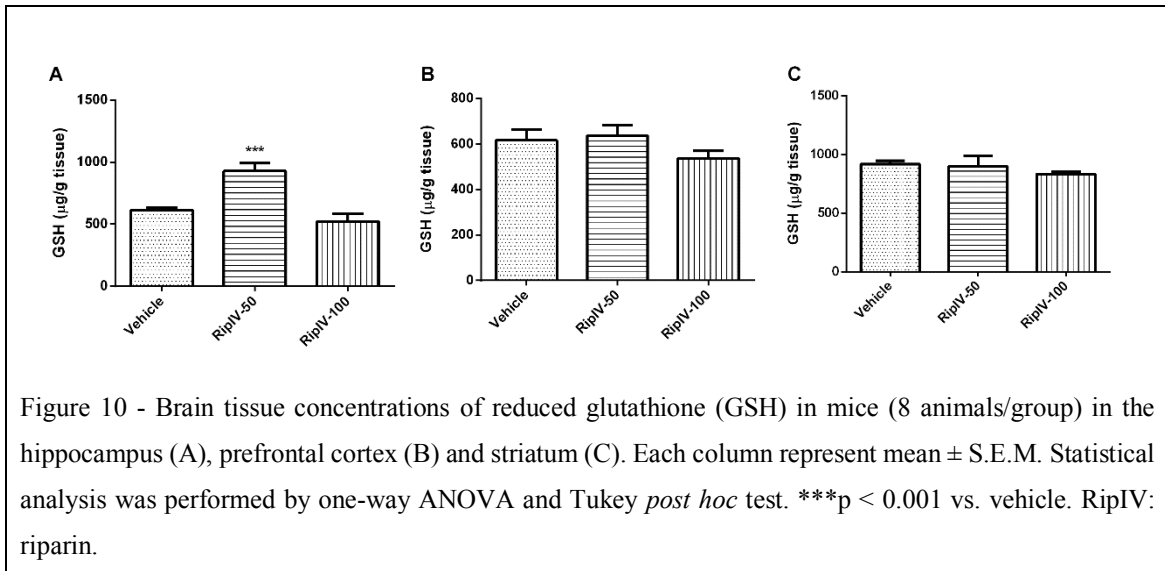
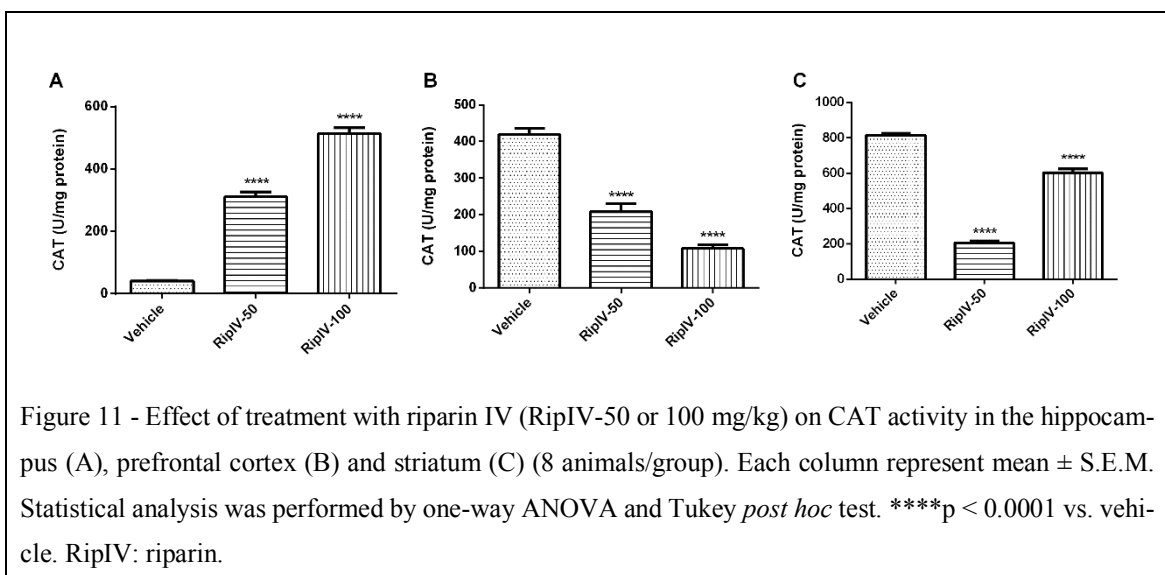


Figure 10 shows GSH levels in the hippocampus (A), the prefrontal cortex (B), and the striatum (C). Riparin IV (50 mg/kg) significantly increased levels of GSH in the hippocampus (vehicle:  $613.4 \pm 21.30$ ; RipIV-50:  $928.7 \pm 62.51$ ), but not in the prefrontal cortex or the

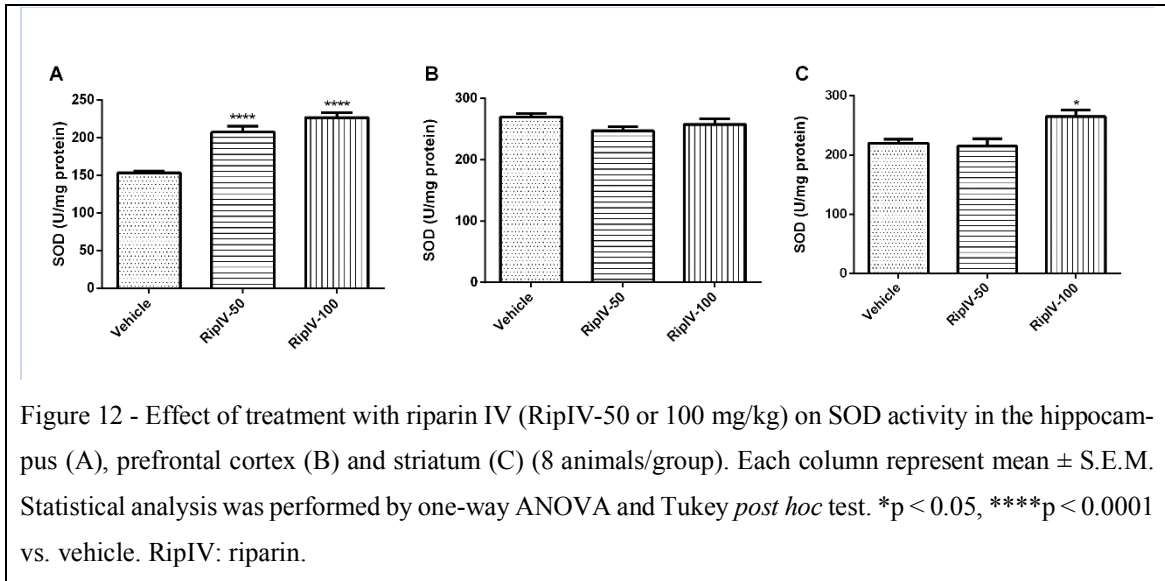
striatum (hippocampus:  $F(2, 21) = 17.39, P < 0.0001$ ; prefrontal cortex:  $F(2, 21) = 1.504, P = 24.52$ ; striatum:  $F(2, 21) = 0.6321, P = 0.5413$ ).



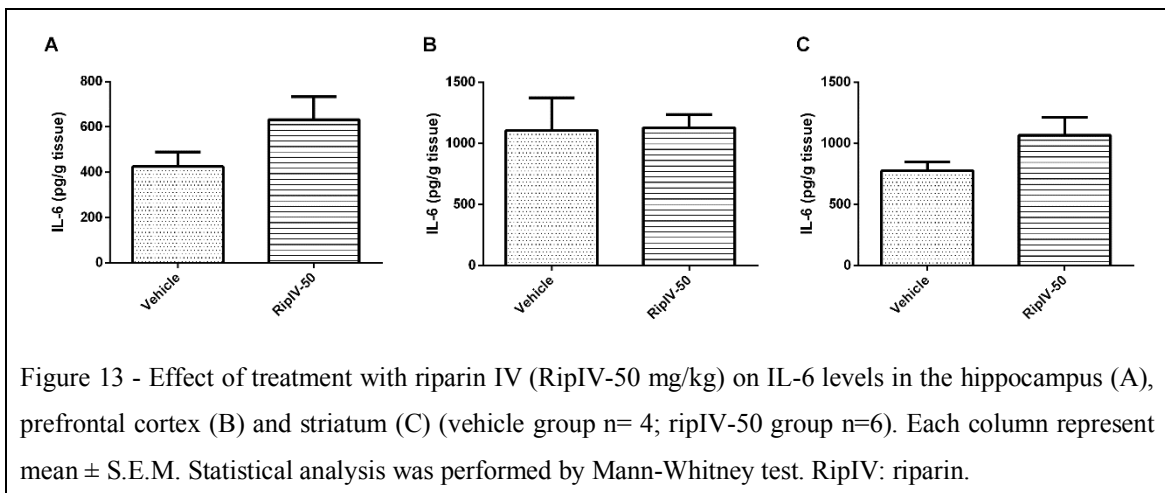
The results in Figure 11 show the effect of riparin IV on CAT activity, demonstrating a significant increase in the doses 50 mg/kg and 100 mg/kg riparin IV versus vehicle in the hippocampus (vehicle:  $41.04 \pm 1.966$ ; RipIV-50:  $310.9 \pm 15.42$ ; RipIV-100:  $513.2 \pm 19.16$ ), and a significant inverse relationship in the prefrontal cortex and the striatum (hippocampus:  $F(2, 21) = 276.5, P < 0.0001$ ; prefrontal cortex:  $F(2, 21) = 82.71, P < 0.0001$ ; striatum:  $F(2, 21) = 390.5, P < 0.0001$ ).

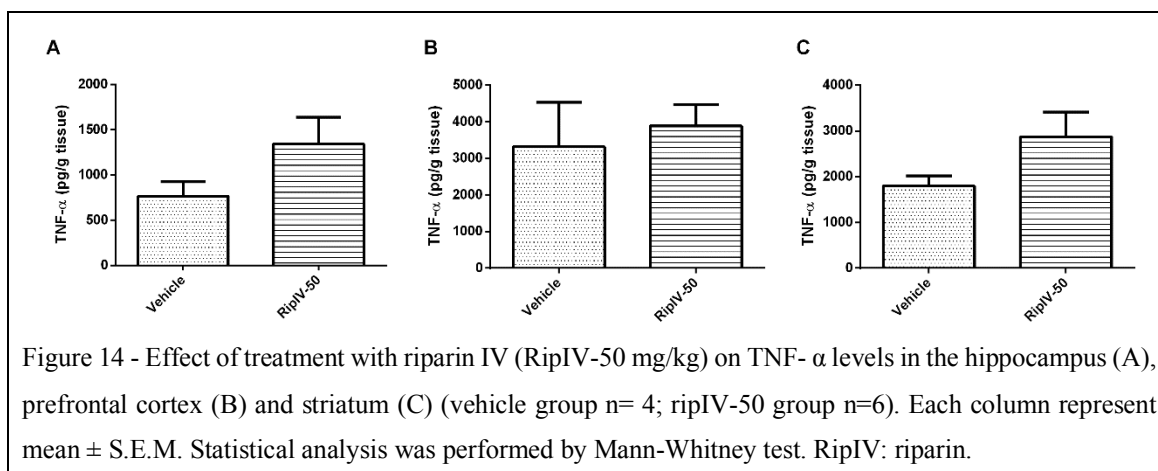


In this study, we observed significantly increased SOD activity, in both doses, in the hippocampus (vehicle:  $153.5 \pm 2.296$ ; RipIV-50:  $207.3 \pm 7.907$ ; RipIV-100:  $226.9 \pm 6.542$ ) and, in the dose of 100mg/kg, in the striatum (vehicle:  $220.1 \pm 6.514$ ; RipIV-100:  $264.811.14$ ) following acute administration of riparin IV, but not in the prefrontal cortex (hippocampus:  $F(2, 21) = 39.22$ ,  $P < 0.0001$ ; prefrontal cortex:  $F(2, 21) = 2.408$ ,  $P = 0.1144$ ; striatum:  $F(2, 21) = 6.713$ ,  $P = 0.0056$ ) (Figure 12).



Figures 13 and 14 demonstrate, respectively, levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in mice treated with vehicle or riparin IV 50 mg/kg, with no change in these cytokines being demonstrated in the three studied cerebral area.





### 3.6. Computational prediction of pharmacokinetics, rule of the five of Lipinski and the affinity and mode of binding of riparin IV to monoaminergic and GABAergic neurotransmission targets.

The physicochemical parameters, pharmacokinetics and the rule of the five of Lipinski of riparin IV are expressed in table 2. *In silico* models demonstrated that the substance has a molecular weight of 345.39 g/mol, value of topological polar surface area (TPSA) of 66.02 Å<sup>2</sup>, does not violate any requirement of Lipinski, has high gastrointestinal absorption and crosses the blood-brain barrier (BBB).

Table 2 - Physicochemical parameters, pharmacokinetics and the rule of five of Lipinski of riparin IV

Molecule	Riparin IV
Formula	C19H23NO5
Molecular weight	345.39 g/mol
TPSA	66.02 Å <sup>2</sup>
Lipinski	Yes; 0 violation
<b>Pharmacokinetics</b>	
GI absorption	High
BBB permeant	Yes
Pgp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	Yes
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Skin permeation log Kp (cm/s)	-6.25

TPSA: topological polar surface area; GI: gastrointestinal; BBB: blood-brain barrier; Pgp: P-glycoprotein; CYP: Cytochrome P450.

To investigate the interaction between riparin IV and target proteins of interest in depression and anxiety, this molecule was anchored with macromolecular structures of serotonin (SERT) and dopamine (DAT) transporters, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, ALPHA<sub>2A</sub>, ALPHA<sub>2B</sub>, MAO-B and GABA<sub>A</sub> receptors (table 3). The results were described in terms of docking score, glide ligand efficiency, XP GScore and glide energy. The docking coupling scores for all compounds ranged from -8.804 to -3.984, and riparin IV interaction was more promising (lower binding energy) with the MAO-B enzyme (-8,804), followed by the serotonin transporter (-7,353), the D2 receptor (-7,333) and the dopamine transporter (-7.284).

Table 3 – Docking score, glide ligand efficiency, XP GScore and glide energy from the interaction of riparin IV with proteins involved in depression and anxiety.

Protein	PDB ID or model	Binding site	Drug	Docking score	Glide ligand efficiency	XP GScore	Glide energy
SERT	5I73	68P-ESCITALOPRAM	Riparin IV	-7.353	-0.294	-7.353	-42.204
			Escitalopram*	-7.532	-0.314	-7.532	-31.627
5-HT <sub>2A</sub> Receptor	6A93	8NU-RISPERIDONE	Riparin IV	-6.534	-0.261	-6.534	-47.35
			Risperidone*	-11.166	-0.372	-11.176	-55.969
5-HT <sub>2C</sub> Receptor	6BQH	E2J-RITANSERIN	Riparin IV	-6.91	-0.276	-6.91	-45.947
			Ritanserine*	-15.74	-0.463	-15.768	-72.791
5-HT <sub>3</sub> Receptor	5AIN	QMR-VARENICICLINE	Riparin IV	-3.984	-0.159	-3.984	-32.599
			Varenicline*	-14.39	-0.899	-14.39	-47.115
5-HT <sub>3</sub> Receptor	2YME	CWB-GRANISETRON	Riparin IV	-3.986	-0.159	-3.986	-40.485
			Granisetron*	-16.115	-0.701	-16.116	-44.19
DAT	4M48	21B-NORTRIPTYLINE	Riparin IV	-7.284	-0.291	-7.284	-43.368
			Nortriptyline*	-6.234	-0.312	-6.234	-27.969
D <sub>1</sub> Receptor	SWISS MODEL	POCKDRUG PREDICTION	Riparin IV	-4.19	-0.168	-4.19	-37.038
D <sub>2</sub> Receptor	6CM4	8NU-RISPERIDONE	Riparin IV	-7.333	-0.293	-7.333	-45.694
			Risperidone*	-11.802	-0.393	-11.812	-57.087
ALPHA <sub>2A</sub> Receptor	SWISS MODEL	POCKDRUG PREDICTION	Riparin IV	-5.224	-0.209	-5.224	-40.977
ALPHA <sub>2B</sub> Receptor	SWISS MODEL	POCKDRUG PREDICTION	Riparin IV	-4.286	-0.171	-4.286	-39.03
MAO-B Enzyme	2VZ2	MFG-MOFEGILINE	Riparin IV	-8.804	-0.352	-8.804	-55.253
			MFG*	-6.723	-0.517	-6.723	-30.045
GABA <sub>A</sub> Receptor	6D6T	FYP-FLUMAZENIL	Riparin IV	-6.362	-0.254	-6.362	-46.387
			Flumazenil*	-6.499	-0.295	-6.5	-42.761

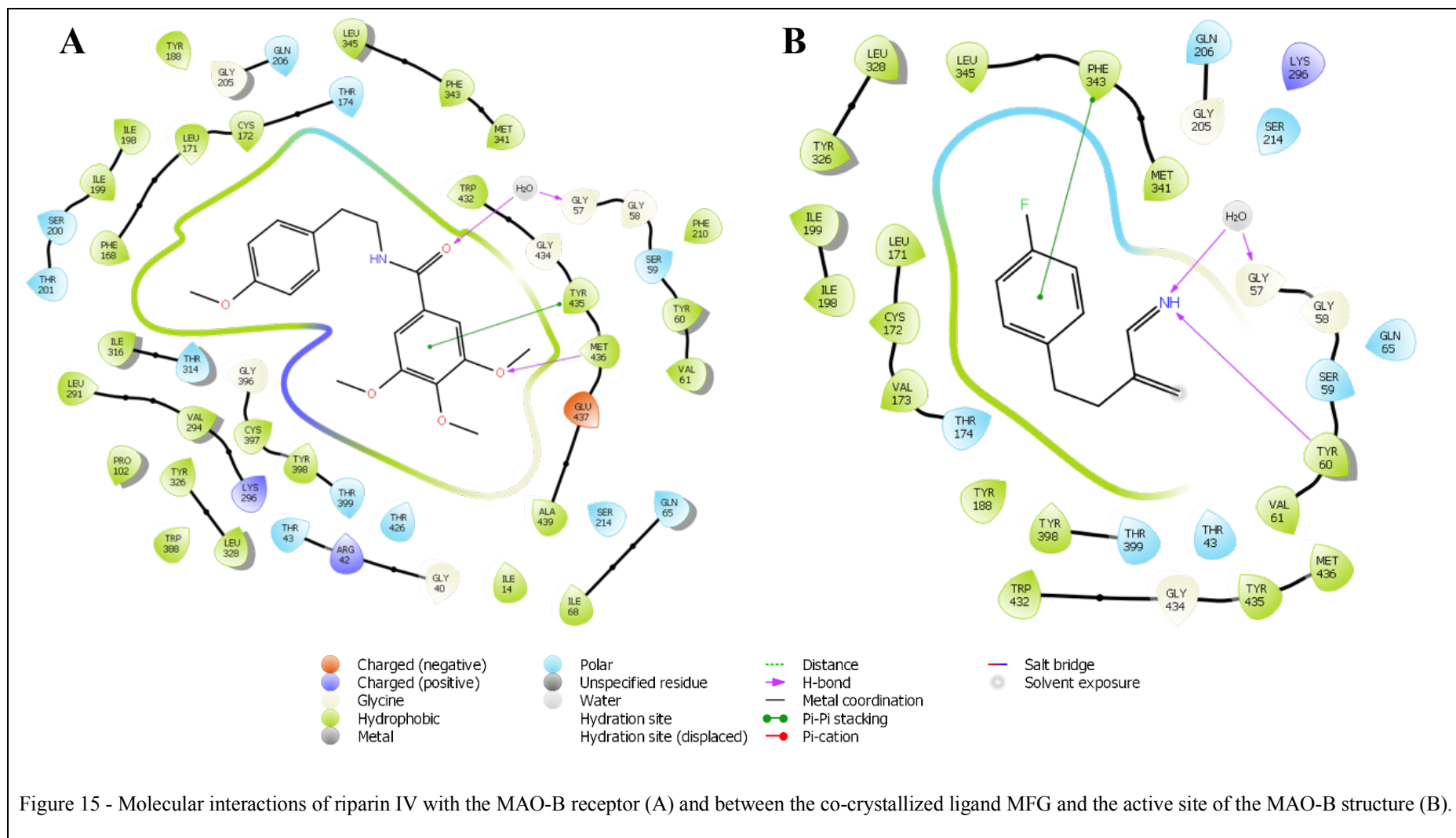
\*Redocking; SERT: serotonin transporter; 5-HT: serotonin; DAT: dopamine transporter; MAO: Monoamine oxidase; GABA: Gamma-AminoButyric Acid.

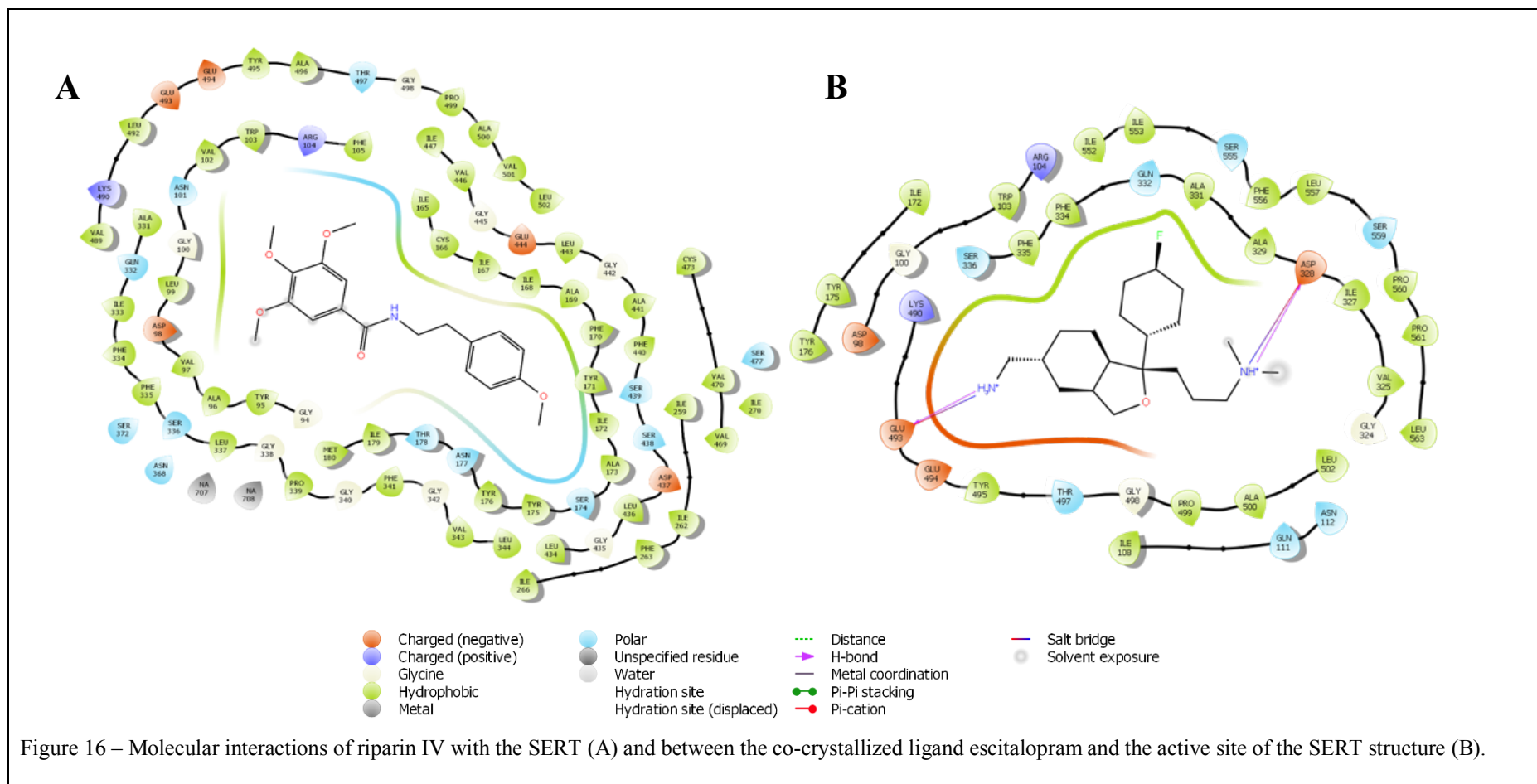
The interaction of riparin IV with the MAO-B receptor presented intermolecular interactions of the Pi-Pi stacking type with TYR 435, hydrogen bonding directly with the



residue MET 436 and with a water molecule of solvation that also performs hydrogen bonding with the residue GLY 57. In addition to an extensive surface for hydrophobic interactions (ILE 14, TYR 60, VAL 61, ILE 68, PRO 102, PHE 168, LEU 171, CYS 172, TYR 188, ILE 198, ILE 199, PHE 210, LEU 291, VAL 294, ILE 316, TYR 326, LEU 328, MET 341, PHE 343, LEU 345, TRP 388, CYS 397, TYR 398, TRP 432, TYR 435, MET 436, ALA 439) in the interaction site of MAO-B, it was possible to observe the presence of positive (ARG 42 and LYS 296) and negatively charged residues (GLU 437). Figure 15 demonstrates these molecular interactions of riparin IV with the MAO-B receptor and also between the co-crystallized mofegiline (MFG) linker and the active site of the MAO-B structure.

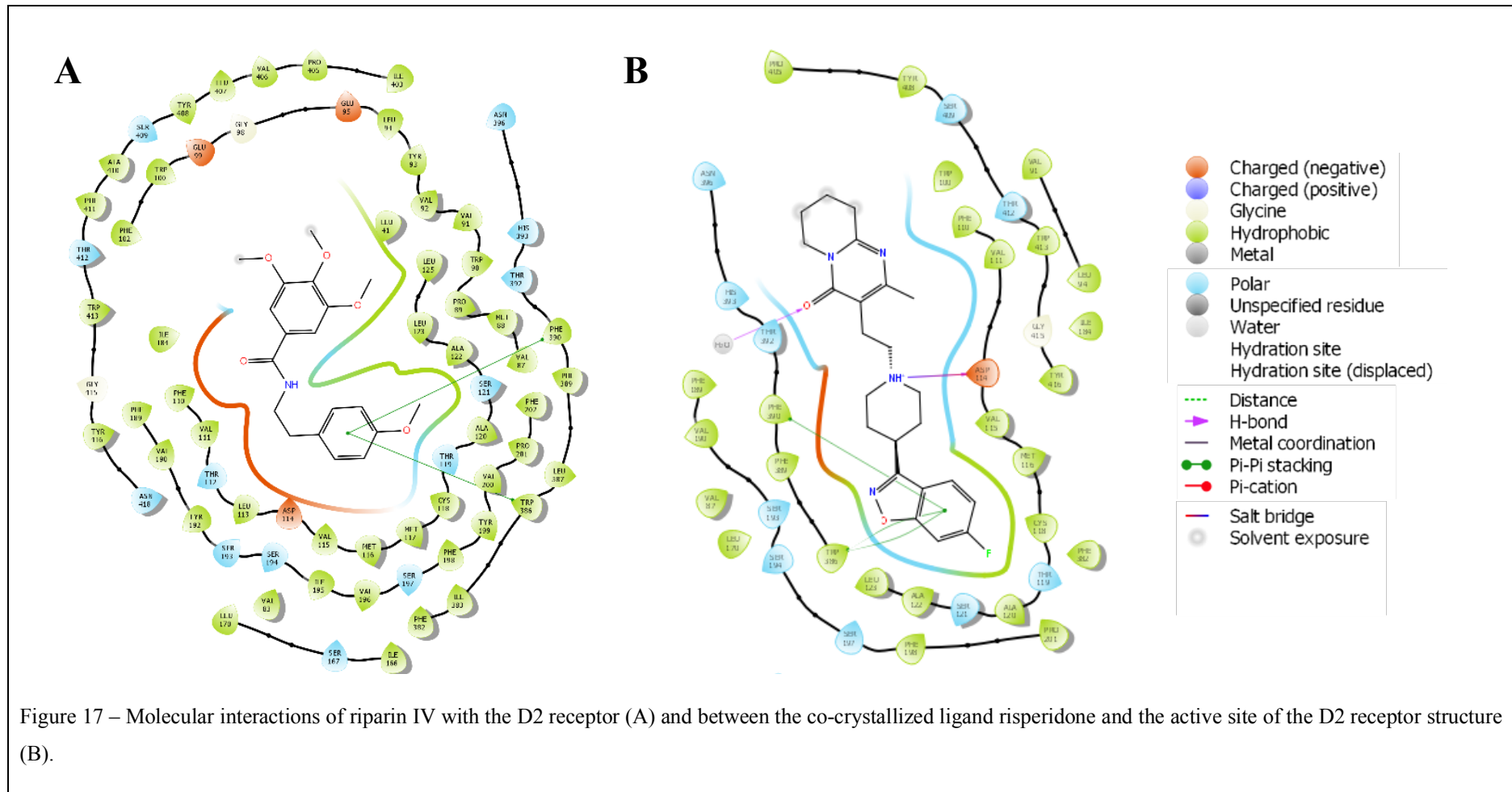
Figure 16 demonstrates these molecular interactions of riparin IV with the SERT and also between the co-crystallized escitalopram linker and the active site of the SERT structure. The interaction of riparin IV with the serotonin transporter (SERT) presented a large solvent exposure in the tetrasubstituted aromatic nucleus, as well as an extensive surface for hydrophobic (TYR 95, ALA 96, VAL 97, LEU 99, VAL 102, TRP 103, PHE 105, ILE 165, CYS 166, ILE 167, ILE 168, ALA 169, PHE 170, TYR 171, ILE 172, ALA 173, TYR 175, TYR 176, ILE 179, MET 180, ILE 259, ILE 262, PHE 263, ILE 266, ILE 270, ALA 331, ILE 333, PHE 334, PHE 335, LEU 337, PRO 339, PHE 341, VAL 343, LEU 344, LEU 434, LEU 436, PHE 440, ALA 441, LEU 443, VAL 446, ILE 447, VAL 469, VAL 470, CYS 473, VAL 489, LEU 492, TYR 495, ALA 496, PRO 499, ALA 500, VAL 501, LEU 502) and hydrophilic interactions (ASN 101, SER 174, ASN 177, THR 178, GLN 332, SER 336, ASN 368, SER 372, SER 438, SER 439, SER 477, THR 497). In the SERT interaction site, it was possible to observe the presence of positive (ARG 104 and LYS 490) and negatively charged residues (ASP 98, ASP 437, GLU 444, GLU 493 and GLU 494).





The binding of riparin IV to the D2 receptor showed intermolecular interactions of the Pi-Pi stacking type with TRP 386 and PHE 390. In addition to a surface for hydrophobic interactions (LEU 41, VAL 83, VAL 87, MET 88, PRO 89, TRP 90, VAL 91, VAL 92, TYR 93, LEU 94, TRP 100, PHE 102, PHE 110, VAL 111, LEU 113, VAL 115, MET 116, MET 117, CYS 118, ALA 120, ALA 122, LEU 123, LEU 125, ILE 166, LEU 170, ILE 184, PHE 189, VAL 190, TYR 192, VAL 196, PHE 198, TYR 199, VAL 200, PRO 201, PHE 202, PHE 382, ILE 383, TRP 386, LEU 387, PHE 389, PHE 390, ILE 403, PRO 405, VAL 406, TYR 408, ALA 410, PHE 411, TRP 413, TYR 416) at the D2 interaction site, it was possible to observe the presence of negatively charged residues (GLU 95, GLU 99 and ASP 114) and solvent exposure on two methoxyl radicals attached to the tetrasubstituted aromatic ring. Figure 17 demonstrates these molecular interactions of riparin IV with the D2 receptor and also between the co-crystallized risperidone linker and the active site of the D2 receptor structure.

The interaction of riparin IV with the dopamine transporter (DAT) presented a solvent exposure on two methoxyl radicals attached to the tetrasubstituted aromatic ring, as well as an extensive surface for hydrophobic (PHE 43, LEU 47, ALA 48, TRP 51, VAL 113, VAL 114, ILE 116, ALA 117, PHE 118, TYR 119, VAL 120, TYR 123, TYR 124, ILE 127, ILE 128, PHE 318, PHE 319, PHE 325, VAL 327, LEU 419, PHE 423, ALA 428, ILE 429, TYR 455, LEU 474, TYR 477, ALA 478, ALA 479, TYR 481, ILE 483). In the DAT interaction site, it was possible to observe the presence of positive (ARG 476) and negatively charged residues (ASP 46, ASP 121, ASP 420 and ASP 475). Figure 18 demonstrates these molecular interactions of riparin IV with the DAT and also between the co-crystallized nortriptyline linker and the active site of the DAT structure.



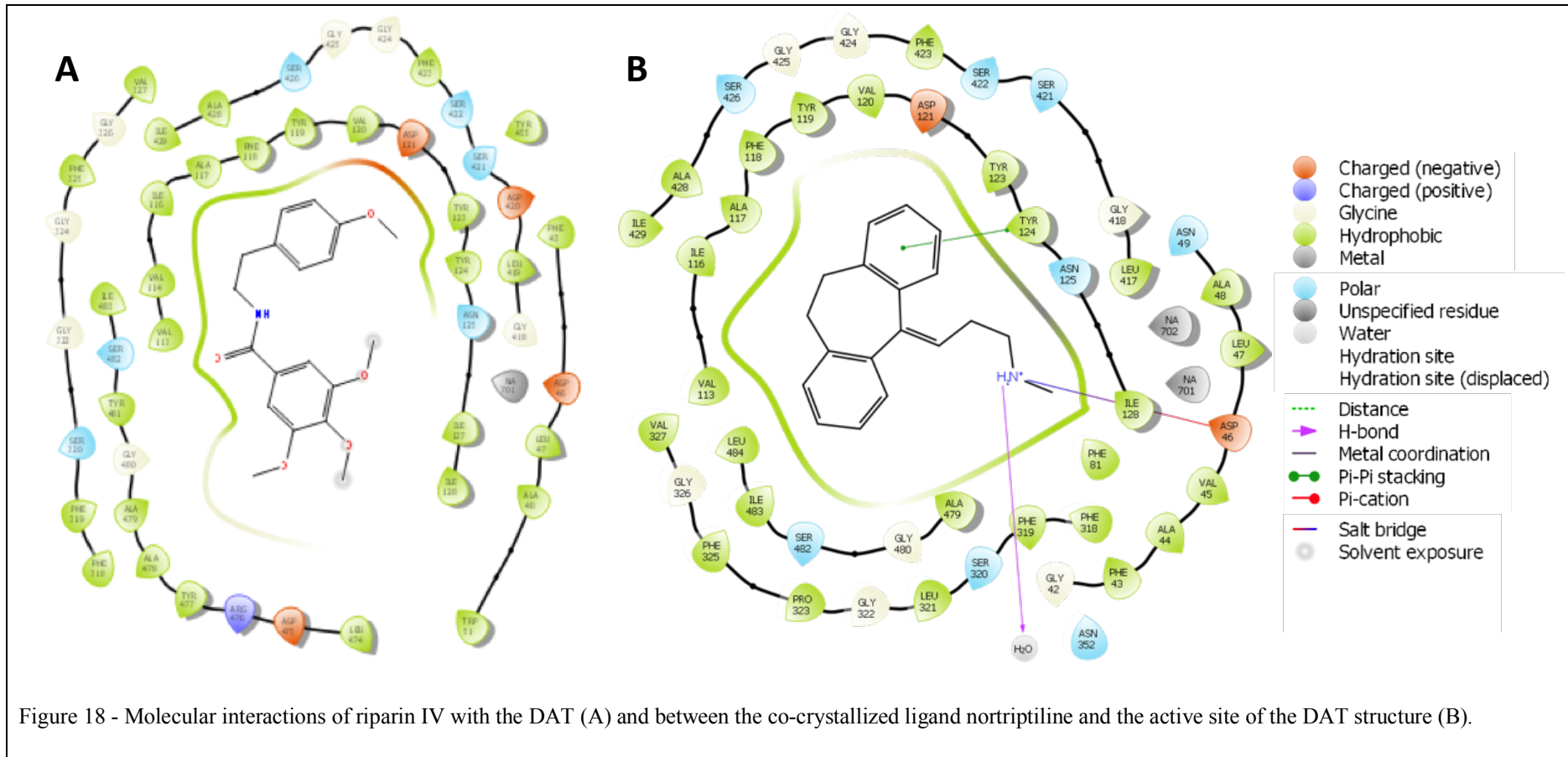


Figure 18 - Molecular interactions of riparin IV with the DAT (A) and between the co-crystallized ligand nortriptyline and the active site of the DAT structure (B).

#### 4. DISCUSSION

Substantial progress has been made in development of treatments for major depression. However, not all patients with depression recover with available treatments and several important challenges need to be resolved to improve existing treatments and to increase the number of patients who benefit from them (Cuijpers, 2018).

Thus, in this study we verified the antidepressant activity of riparin IV in mice, and evaluated possible mechanisms of action. Riparin IV (50 and 100 mg/kg) exhibited antidepressant activity, as demonstrated by reduction of immobility time in the FST and TST compared with that in vehicle. Similar results were obtained in response to fluoxetine and bupropion treatment. FST and TST are typically employed for screening of antidepressant activity of different drugs (Abelaira *et al.*, 2013).

Increased number of entries and time spent in open arms in the EPM test is a reliable and accurate indicator of decreased anxiety or anxiolytic activity of a compound (Bhatt *et al.*, 2013; Biala and Kruk, 2008; Yadav *et al.*, 2008). In this study, treatment with riparin IV (50 mg/kg) produced anxiolytic-like effects as evidenced by results of the EPM test. Results were similar to those observed in response to diazepam.

In the HBT test, acute administration of riparin IV at doses of 50 and 100 mg/kg resulted in a significant increase in head dips compared to that of the control group. Similar results were observed in response to diazepam treatment. HBT is another popular method for evaluation of anxiolytic activity, since it is a simple procedure that measures behavioral response of rodents in an unknown environment (Hranilovic *et al.*, 2005).

Comorbidity of depression and anxiety is common. Patients that suffer from both disorders are more resistant to pharmacological treatment and have a worse prognosis. As such, the search for new antidepressants that treat both disorders is important (Ballenger, 2000). In this study, we showed that riparin IV exhibited both anxiolytic-like and antidepressant-like activity in mice following a single dose.

Unlike diazepam (Jawad *et al.*, 2017), riparin IV did not induce sedative and muscle relaxant effects, as evidenced by a lack of effect on spontaneous locomotor activity and motor coordination in the OFT and RRT tests, respectively. Reduction of spontaneous locomotor activity and alterations on rotarod performance are typically attributed to potential sedative effects and motor impairment in response to a given substance (Vogel, 2008).

Although several hypotheses have been proposed, the monoamine hypothesis (serotonin, noradrenaline and dopamine) is the most prevalent explanation of depression, since most currently available antidepressants act on monoamine transporters or receptors. However, this hypothesis does not completely explain the mechanism of depression pathogenesis. As such, other hypotheses have been proposed suggesting that inflammation, oxidative stress, and neurotrophic factors also contribute to pathophysiology of depression (Pasquali *et al.*, 2018).

In the present study, results showed a significant increase in levels of monoamines and their metabolites, suggesting the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant effects of riparin IV. To further characterize the role of neurotransmitters in its mechanism, specific antagonists of noradrenaline, dopamine, serotonin, and GABA receptors were used to evaluate anxiolytic effects.

The effect observed in the FST indicates that riparin IV can exert its effects related to dopaminergic, serotonergic, and  $\alpha 2$  adrenergic systems. Studies have demonstrated the involvement of these systems in the actions of antidepressants (Köhler *et al.*, 2016; Paparrigopoulos *et al.*, 2001; Porcelli *et al.*, 2011). In some depressive patients, dopamine-related disturbances are improved by treatment with antidepressant drugs, apparently acting on serotonergic or noradrenergic circuits (Dunlop and Nemeroff, 2007). Thus, the effect of riparin IV on the central nervous system seems to correlate with elevation of monoamines levels and interaction with monoaminergic receptors.

The present study also demonstrated that riparin IV was antagonized by flumazenil, suggesting participation of the GABAergic system in its anxiolytic-like effects. In contrast to diazepam, riparin IV did not induce a sedative effect. GABA receptor modulators have exhibited potential as novel anxiolytics superior to classic benzodiazepines because of lack of sedation and reduced potential for dependence (Möhler, 2012).

Inflammation and mitochondrial oxidative processes generate free radicals, which are highly reactive chemical species. Excess radicals or disruption of antioxidant systems results in increased reactive oxygen species (ROS), which can covalently modify and damage cell macromolecules such as fatty acids, DNA, and proteins. The brain, because of its high metabolic rate, is particularly vulnerable to the harmful effects of ROS (Maes, 2011).

Free radicals are associated with the pathogenesis of many diseases, including depression and anxiety (Bouayed *et al.*, 2009). Because of their high reactivity, free radicals can form a series of reactive species, such as ROS. If free radicals are not neutralized, they can



cause oxidative stress, exacerbation of inflammation, and tissue damage. Production of excess ROS can be neutralized by different antioxidant enzymes, such as SOD, glutathione peroxidase (GPx), or CAT (Maes, 2011; Sarandol *et al.*, 2007).

Due to their chemical characteristics, ROS can initiate lipid peroxidation, which involves oxidative decomposition of polyunsaturated fatty acids in membrane phospholipids, leading to the formation of lipid hydroperoxide mixtures, and aldehyde terminal products such as MDA (Girotti, 1998; Mittler, 2002). Therefore, increased production of MDA is indicative of the occurrence of oxidative damage to membranes (Bettio *et al.*, 2014).

Acute administration of 50 mg/kg riparin IV decreased MDA levels in the hippocampus, the prefrontal cortex, and the striatum, and at a dose of 100 mg/kg in the hippocampus and the striatum. Interestingly, some studies have shown increased levels of MDA associated with depression and anxiety (Bajpai *et al.*, 2014; van Velzen *et al.*, 2017).

Decreased nitrite/nitrate levels in response to riparin IV confirmed its antidepressant and antioxidant effects, as previous studies showed that nitrite free radical may be associated with depression. In addition, high levels of peroxynitrite and its precursor, nitric oxide, play a well-characterized role in the pathophysiology of depression (Kumar *et al.*, 2011).

Detoxification of ROS by GSH, the main non-protein thiol in mammalian cells, is necessary to maintain redox balance and prevent damage to cells (Lu, 2009). Riparin IV at 50 mg/kg increased GSH levels in the hippocampus.

Superoxide radical is generated as a product of mitochondrial oxidative phosphorylation and from normal cellular biochemical reactions, but excessive amounts can lead to cellular damage. Rapid and efficient removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is essential for all living cells. Under aerobic conditions, CAT plays a significant role in hydrogen peroxide metabolism (Sharma *et al.*, 2012). Riparin IV increased CAT activity in the hippocampus and significantly decreased its activity in the prefrontal cortex and the striatum. The role of CAT in depression is not well-characterized, but studies have shown that systemic CAT levels were lower in depressed patients (Ozcan *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2009). SOD catalyzes dismutation of superoxide radical and is the first line of defense against superoxide (Bhattacharyya *et al.*, 2014; Rahman, 2007). In our study, riparin IV, at both doses, increased SOD levels in the hippocampus and at the dose of 100 mg/kg increased SOD activity in the striatum.

Data from this study had demonstrated the important neuroprotective effects of riparin IV as evidenced by alterations in TBARS, nitrite/nitrate, GSH, SOD, and CAT. These effects were most pronounced in the hippocampus, a region responsible for adaptation to stress and antidepressant behavioral effects (Joca and Guimarães, 2006). The hippocampus plays a central role in emotional processing, and is involved in the regulation and control of the anxiety response and conditioned fear (Raio and Phelps, 2015).

Oxidative stress is a critical pathway for damage in the pathophysiology of stress-induced depression (Maes *et al.*, 2011). Thus, the ability of riparin IV to revert behavioral changes may be related to its protective effects against oxidative damage in the hippocampus. The association between depression and lipid peroxidation has also been observed in human (Hovatta *et al.*, 2010), suggesting that the neuroprotective effects of riparin IV observed may also be observed in persons.

Pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ , play multiple roles in both neurodegeneration and protection (Chitnis and Weiner, 2017; Masih and J.M.I. Verbeke, 2018). The literature shows that there is no consensus on the effect of the available antidepressants on proinflammatory cytokines, since fluoxetine decrease levels of IL-6 and TNF- $\alpha$ , while others, such as venlafaxine, tend to increase their levels (Baumeister *et al.*, 2016). In this study, acutely administered riparin IV did not show any significant changes in IL-6 and TNF- $\alpha$  levels, however, chronic administration modified the balance of the th1/th2 profile (unpublished data).

*In silico* study demonstrated that riparin IV has Topological Polar Surface Area (TPSA) 66.02 Å<sup>2</sup> and does not show any violation of the Lipinski rule. The TPSA is important for permeability estimation and oral bioavailability (Leeson, 2016). Studies show that values below 80 Å<sup>2</sup> create favorable conditions for the penetration of the blood-brain barrier, which is important for potential brain receptor ligands (Clark, 2003; Di and Kerns, 2014; Mahar Doan *et al.*, 2002; Żółek and Maciejewska, 2017). The Lipinski's rule of five estimates the solubility and permeability of drugs administered orally, predicting the influence of chemical structure on the absorption of a compound. The fact of Riparin IV does not violated any of Lipinski's rules for oral bioavailability of a drug, makes it a potentially promising agent (Abi Hussein *et al.*, 2017; Lipinski *et al.*, 2001).

Reverse docking showed interaction of riparin IV with the MAO-B receptor, serotonin transporter, D2-like dopamine receptor and dopamine transporter, which corroborates with behavioral and neurochemical tests. The riparin IV effect in the serotonergic system may

be consequence of an interaction with serotonin transporter, leading to an increase of serotonin in synaptic cleft. Studies suggest a substantial relationship between the serotonergic and dopaminergic systems and activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor inhibits dopamine release in the dorsal striatum but may stimulate dopamine release in the prefrontal cortex and *nucleus accumbens*. Otherwise, activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors inhibits mesocortical and mesolimbic dopamine function and stimulation of raphe nuclei serotonergic neuron reduces spontaneous activity of dopamine neurons in the ventral tegmental area and inhibits dopamine-related behaviors, such as locomotor and exploratory behavior (Belujon and Grace, 2017; Dunlop and Nemeroff, 2007). In this way, riparin IV also influence the dopamine system, through the involvement of D2 receptor and/or DAT.

## **5. CONCLUSION**

The present study explored for the first time, acutely, the antidepressant and anxiolytic-like activities of riparin IV. These results demonstrated that riparin IV was promising substance for the treatment of depression and depression associated with anxiety. These properties of riparin IV involved the monoaminergic system and neuroprotective actions against oxidative stress, particularly in the hippocampus of mice, an important brain region related to depression and anxiety.

## **6. CONFLICT OF INTERESTS**

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper. All authors have approved the final article.

## **7. ACKNOWLEDGMENTS**

Many thanks to the Laboratory of Pharmaceutics Technology at Federal University of Paraíba, which provided us with the substance riparin-IV. We are also thankful for the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq-Brazil- process numbers: n° 306746/2013-1 (PQ), n°446120/2014-6 (UNIVERSAL), n° 465536/2014-0 (INCT-RENNOFITO) and n°407567/2013-5 (RENORBIO); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil; finance code 001); and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP-Ceará-Brazil).

## 8. REFERENCES

- Abelaira, H.M., Reus, G.Z., Quevedo, J., Abelaira, H.M., Reus, G.Z., Quevedo, J., 2013. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35, S112–S120. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1098>
- Abi Hussein, H., Geneix, C., Petitjean, M., Borrel, A., Flatters, D., Camproux, A.-C., 2017. Global vision of druggability issues: applications and perspectives. *Drug Discovery Today* 22, 404–415. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.021>
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour* 21, 205–235. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(73\)80065-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80065-X)
- Bajpai, A., Verma, A.K., Srivastava, M., Srivastava, R., 2014. Oxidative stress and major depression. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 8, CC04-7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10258.5292>
- Ballenger, J.C., 2000. Anxiety and Depression: Optimizing Treatments. Primary care companion to the *Journal of clinical psychiatry* 2, 71–79.
- Barbosa Filho, J.M., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 1990. Tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. *Revista Latinoamericana de Quimica* v.21.
- Barbosa-Filho, J.M., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 1990. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. *Ver Latinoamr Quim* 21, 5–7.
- Baumeister, D., Ciufolini, S., Mondelli, V., 2016. Effects of psychotropic drugs on inflammation: consequence or mediator of therapeutic effects in psychiatric treatment? *Psychopharmacology* 233, 1575–1589. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4044-5>
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* 44, 276–87.
- Belujon, P., Grace, A.A., 2017. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *The international journal of neuropsychopharmacology* 20, 1036–1046. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx056>
- Bettio, L.E.B., Freitas, A.E., Neis, V.B., Santos, D.B., Ribeiro, C.M., Rosa, P.B., Farina, M., Rodrigues, A.L.S., 2014. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 127, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.10.002>
- Bhatt, S., Mahesh, R., Devadoss, T., Jindal, A.K., 2013. Anxiolytic-like effect of (4-benzylpiperazin-1-yl)(3-methoxyquinoxalin-2-yl)methanone (6g) in experimental mouse models of anxiety. *Indian journal of pharmacology* 45, 248–51. <https://doi.org/10.4103/0253->

7613.111923

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E., 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews* 94, 329–54. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>

Biala, G., Kruk, M., 2008. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the anxiogenic effects of d-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.07.006>

Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T., 2017. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research* 45, D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>

Binfaré, R.W., 2009. Investigação do efeito do ácido ascórbico em modelos animais preditivos de ação antidepressiva.

Bouayed, J., Rammal, H., Soulimani, R., 2009. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2, 63–7.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Carlini, E.A., Burgos, V., 1979. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. *Rev Assoc Bras Psiquiatr* 3, 25–31.

Chance, B., Maehly, A.C., 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases. {black small square}. *Methods in Enzymology* 2, 764–775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)

Chaves, E.M.C., Honório-Júnior, J.E.R., Sousa, C.N.S., Monteiro, V.S., Nonato, D.T.T., Dantas, L.P., Lúcio, A.S.S.C., Barbosa-Filho, J.M., Patrocínio, M.C.A., Viana, G.S.B., Vasconcelos, S.M.M., 2018. The anxiolytic-like effect of 6-styryl-2-pyrone in mice involves GABAergic mechanism of action. *Metabolic Brain Disease* 33, 139–149. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0139-5>

Chitnis, T., Weiner, H.L., 2017. CNS inflammation and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* 127, 3577–3587. <https://doi.org/10.1172/JCI90609>

Citó, M.C.O., Silva, M.I.G., Santos, L.K.X., Fernandes, M.L., Melo, F.H.C., Aguiar, J.A.C., Lopes, I.S., Sousa, P.B., Vasconcelos, S.M.M., Macêdo, D.S., Sousa, F.C.F., 2014. Antidepressant-like effect of *Hoodia gordonii* in a forced swimming test in mice:

evidence for involvement of the monoaminergic system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48, 57–64. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20144215>

Clark, D.E., 2003. In silico prediction of blood–brain barrier permeation. *Drug discovery today* 8, 927–933.

Clark, G., Koester, A.G., Pearson, D.W., 1971. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. *Psychopharmacologia* 20, 169–71.

Cuijpers, P., 2018. The Challenges of Improving Treatments for Depression. *JAMA*. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.17824>

Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

Di, L., Kerns, E.H., 2014. *Drug-like Properties: from ADME to Toxicity Optimization*. Elsevier Science, Burlington.

Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E.H., Nadjmouddine, M., Cherrah, Y., Alaoui, K., 2015. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. *Behavioral and Brain Functions* 11, 19. <https://doi.org/10.1186/s12993-015-0063-y>

Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in enzymology* 186, 421–31.

Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice\*\*College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)* 46, 208–209. <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>

Dunlop, B.W., Nemeroff, C.B., 2007. The Role of Dopamine in the Pathophysiology of Depression. *Arch Gen Psychiatry* 64, 327. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.3.327>

File, S.E., Wardill, A.G., 1975. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44, 53–9.

Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., Mainz, D.T., 2006. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>

Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research* 39, 1529–42.

Goodwin, G.M., 2015. The overlap between anxiety, depression, and obsessive-compulsive disorder. *Dialogues in clinical neuroscience* 17, 249–60.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry* 126, 131–8.

Gu, X., Zhou, Y., Wu, X., Wang, F., Zhang, C.-Y., Du, C., Shen, L., Chen, X., Shi, J., Liu, C., Ke, K., 2015. Antidepressant-like effects of auraptinol in mice. *Scientific Reports* 4, 4433. <https://doi.org/10.1038/srep04433>

Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T., 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS* 30, S162–S173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>

Hovatta, I., Juhila, J., Donner, J., 2010. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neuroscience Research* 68, 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.08.007>

Hranilovic, D., Cicinsain, L., Bordukaloniksic, T., Jernej, B., 2005. Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: Differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research* 165, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.008>

Jawad, M., Khan, H., Pervez, S., Bawazeer, S.S., Abu-Izneid, T., Saeed, M., Kamal, M.A., 2017. Pharmacological validation of the anxiolytic, muscle relaxant and sedative like activities of *Capsicum annuum* in animal model. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 12, 439. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i4.33182>

Joca, S.R.L., Guimarães, F.S., 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* 185, 298–305. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0326-2>

Köhler, S., Cierpinsky, K., Kronenberg, G., Adli, M., 2016. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. *Journal of Psychopharmacology* 30, 13–22. <https://doi.org/10.1177/0269881115609072>

Kumar, A., Garg, R., Gaur, V., Kumar, P., 2011. Nitric oxide modulation in protective role of antidepressants against chronic fatigue syndrome in mice. *Indian journal of pharmacology* 43, 324–9. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81506>

Leeson, P.D., 2016. Molecular inflation, attrition and the rule of five. *Advanced Drug Delivery Reviews, Understanding the challenges of beyond-rule-of-5 compounds* 101, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.018>

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3–26.

Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180–5.

Lu, S.C., 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>

Maes, M., 2011. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 664–675. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.014>

Maes, M., Galecki, P., Chang, Y.S., Berk, M., 2011. 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 and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.004>

Mahar Doan, K.M., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Wring, S.A., Serabjit-Singh, C.J., Adkison, K.K., Polli, J.W., 2002. ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISM, AND EXCRETION-Passive Permeability and P-Glycoprotein-Mediated Efflux Differentiate Central Nervous System (CNS) and Non-CNS Marketed Drugs Larry J/Shampine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303, 1029–1037.

Masih, J., J.M.I. Verbeke, W., 2018. Immune System Function and its Relation to Depression: How Exercise can Alter the Immune System-Depression Dynamics. *Journal of Depression and Anxiety* 07. <https://doi.org/10.4172/2167-1044.1000325>

Melo, C.T.V. de, 2013. Investigação do efeito antidepressivo da riparina III : alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7, 405–10.

Möhler, H., 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.040>

Moniruzzaman, Md., Atikur Rahman, Md., Ferdous, A., 2015. Evaluation of Sedative and Hypnotic Activity of Ethanolic Extract of *Scoparia dulcis* Linn. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/873954>

Nascimento, O., Espírito-Santo, R., Opretzka, L., Barbosa-Filho, J., Gutierrez, S., Villarreal, C., Soares, M., 2016. Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. *Molecules* 21, 1757. <https://doi.org/10.3390/molecules21121757>

Oliveira, D.C., Silva, M.L., Soares, F. de J., Sampaio, S.C., Bittencourt, F.O., Duarte, S.F.P., 2017. Avaliação da Depressão em Funcionários de uma Instituição de Ensino Superior Particular em Vitória da Conquista – BA. *Id on Line REVISTA DE PSICOLOGIA* 11,



392–404. <https://doi.org/10.14295/online.v11i35.743>

OPAS/OMS, 2018. Folha informativa - Depressão [WWW Document]. URL [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=822](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=822) (accessed 9.30.18).

Ozcan, M.E., Gulec, M., Ozerol, E., Polat, R., Akyol, O., 2004. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *International clinical psychopharmacology* 19, 89–95.

Paparrigopoulos, T., Psarros, C., Bergiannaki, J.-D., Varsou, E., Dafni, U., Stefanis, C., 2001. Melatonin response to clonidine administration in depression: indication of presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptor dysfunction. *Journal of Affective Disorders* 65, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(00\)00270-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(00)00270-6)

Pasquali, M.A., Harlow, B.L., Soares, C.N., Otto, M.W., Cohen, L.S., Minuzzi, L., Gelain, D.P., Moreira, J.C.F., Frey, B.N., 2018. A longitudinal study of neurotrophic, oxidative, and inflammatory markers in first-onset depression in midlife women. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 268, 771–781. <https://doi.org/10.1007/s00406-017-0812-z>

Porcelli, S., Drago, A., Fabbri, C., Serretti, A., 2011. Mechanisms of antidepressant action: An integrated dopaminergic perspective. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 1532–1543. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2011.03.005>

Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 229, 327–336.

Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging* 2, 219–36.

Raio, C.M., Phelps, E.A., 2015. The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. *Neurobiology of Stress* 1, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.004>

Sarandol, A., Sarandol, E., Eker, S.S., Erdinc, S., Vatansever, E., Kirli, S., 2007. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative–antioxidative systems. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 22, 67–73. <https://doi.org/10.1002/hup.829>

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry* 25, 192–205.

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species,

Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Sigma-Aldrich, 2018. Tyramine [WWW Document]. 2018. URL <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/t90344?lang=en&region=US> (accessed 11.19.18).

Souza, F.C.B. de, 2017. Ansiedade, depressão e qualidade de vida em mulheres usuárias de contraceptivos hormonais orais.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367–70.

Teixeira, C.P.L., de Melo, C.T.V., de Araújo, F.L.O., de Carvalho, A.M.R., Silva, M.I.G., Barbosa-Filho, J.M., Macêdo, D.S., de Barros Viana, G.S., de Sousa, F.C.F., 2013. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27, 129–137. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.00973.x>

van Velzen, L.S., Wijdeveld, M., Black, C.N., van Tol, M.-J., van der Wee, N.J.A., Veltman, D.J., Penninx, B.W.J.H., Schmaal, L., 2017. Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 76, 140–144. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2017.02.017>

Vismari, L., Alves, G.J., Palermo-Neto, J., 2008. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)* 35, 196–204. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832008000500004>

Vogel, H.G., 2008. Drug discovery and evaluation : pharmacological assays. Springer.

Wei, Y., Zhou, F., He, D., Bai, J., Hui, L., Wang, X., Nan, K., 2009. The level of oxidative stress and the expression of genes involved in DNA-damage signaling pathways in depressive patients with colorectal carcinoma. *Journal of Psychosomatic Research* 66, 259–266. <https://doi.org/10.1016/J.JPSYCHORES.2008.09.001>

WHO, 2017. WHO | Depression and Other Common Mental Disorders. WHO.

Yadav, A. V., Kawale, L.A., Nade, V.S., 2008. Effect of *Morus alba* L. (mulberry) leaves on anxiety in mice. *Indian journal of pharmacology* 40, 32–6. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.40487>

Żółek, T., Maciejewska, D., 2017. Theoretical evaluation of ADMET properties for coumarin derivatives as compounds with therapeutic potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 109, 486–502. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.08.036>

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Nos experimentos do nado forçado e da suspensão da cauda, a RipIV reduziu o tempo de imobilidade dos animais, indicando efeito antidepressivo-símile que parece ser mediado por um envolvimento com os sistemas dopaminérgico, receptores D1 e D2; serotoninérgico, receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub>; e noradrenérgico,  $\alpha_2$ ;
- Nos testes do labirinto em cruz elevado e da placa perfurada todos os parâmetros aumentaram, sugerindo um efeito ansiolítico-símile da RipIV, podendo estar relacionado com o receptor GABA<sub>A</sub>, uma vez que seu efeito foi bloqueado pelo flumazenil, um antagonista benzodiazepínico;
- A RipIV é desprovida de efeito sobre a atividade locomotora e relaxamento muscular, como demonstrado nos testes do campo aberto e barra giratória, respectivamente;
- A RipIV foi capaz de aumentar os níveis das monominas (NA, 5-HT e DA) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado;
- A RipIV apresenta uma ação neuroprotetora, principalmente na região hipocampal, uma vez que os mecanismos oxidantes (MDA e nitrito/nitrato) diminuíram e os níveis dos sistemas antioxidantes (GSH, SOD e CAT) aumentaram;
- A RipIV, administrada de forma aguda, não alterou os níveis de IL-6 e TNF-  $\alpha$ ;
- *In silico*, a RipIV demonstrou atravessar a barreira hematoencefálica, ter alta absorção gastrointestinal e interagir com os receptores MAO-B e D2 e os transportadores de serotonina e dopamina.

O quadro 7 resume os dados comportamentais, monoaminérgicos e do estresse oxidativo após a administração aguda da Riparina IV.

Quadro 7 - Resumo dos dados comportamentais, monoaminérgicos e do estresse oxidativo após a administração aguda da Riparina IV.

Testes Comportamentais	Parâmetro	RipIV 50		RipIV 100		
Nado Forçado	Tempo de imobilidade (s)	↓↓↓↓		↓↓↓↓		
Suspensão da Cauda	Tempo de imobilidade (s)	↓↓↓↓		↓↓↓↓		
Labirinto em Cruz Elevado	%NEBA	↑↑↑↑		⊕		
	%TPBA	↑↑↑		⊕		
Placa Perfurada	Número de imersões	↑↑↑↑		↑↑↑↑		
Campo Aberto	Número de cruzamentos	⊕		⊕		
Barra Giratória	Tempo na barra (s)	⊕		⊕		
Monoaminas e metabólitos	RipIV 50			RipIV 100		
	HIP	CPF	CE	HIP	CPF	CE
Noradrenalina (NE)	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑	⊕	↑↑↑↑	⊕
Dopamina (DA)	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑	⊕	⊕	↑↑↑↑
Ácido diidroxifenilacético (DOPAC)	⊕	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	⊕
Serotonina (5-HT)	⊕	⊕	⊕	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑
Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑	⊕	⊕	⊕
Monoaminas e metabólitos	RipIV 50			RipIV 100		
	HIP	CPF	CE	HIP	CPF	CE
Níveis de MDA (TBARS)	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓	⊕	↓↓↓↓
Produção de nitrito/nitrato	↓↓↓↓	↓↓↓↓	⊕	↓↓↓↓	↓↓↓↓	⊕
Glutaciona reduzida (GSH)	↑↑↑	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Atividade enzimática da catalase (CAT)	↑↑↑↑	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↑↑↑↑	↓↓↓↓	↓↓↓↓
Atividade enzimática da superóxido desmutase (SOD)	↑↑↑↑	⊕	⊕	↑↑↑↑	⊕	↑

Fonte: Autoria própria.

Legenda: ↑ - Aumento significativo vs. veículo ( $p < 0,05$ );  
 ↑↑↑ - Aumento significativo vs. veículo ( $p < 0,001$ );  
 ↑↑↑↑ - Aumento significativo vs. veículo ( $p < 0,0001$ );  
 ↓↓↓↓ - Diminuição significativa vs. veículo ( $p < 0,0001$ );  
 ⊕ - Sem alteração significativa vs. veículo.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, R. N. D. C. DE. **Efeitos comportamentais, neuroquímicos e antioxidante da hecogenina obtida de Agave sisalana Perrine em Camundongos.** 2013.
- AHMAD, A. *et al.* Brain region specific monoamine and oxidative changes during restraint stress. **The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques**, v. 39, n. 3, p. 311–8, maio 2012.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais.** [s.l.] Artmed Editora, 2014.
- ANDREWS, P. W. *et al.* Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 51, p. 164–188, abr. 2015.
- ARAÚJO, F. L. O. DE. **Estudo dos efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de (O-Metil)-N-Benzoil Tiramina (Riparina I) de Aniba Riparia (Nees) Mez (Lauraceae) em camundongos.** 2007.
- ARAÚJO, F. L. O. *et al.* Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 380, n. 4, 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.
- BAHLS, S.-C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. **Interação em Psicologia**, v. 3, n. 1, 31 dez. 1999.
- BANDELOW, B. *et al.* The diagnosis of and treatment recommendations for anxiety disorders. **Deutsches Arzteblatt international**, v. 111, n. 27–28, p. 473–80, 7 jul. 2014.
- BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G. DE; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, dez. 2006.
- BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of Aniba riparia. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615–2617, 1 jan. 1987.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora parai-bana. **Cad. Farm.**, v. 13, n. 2, p. 85–102, 1997.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. The tyramines of Aniba riparia: transformation into models of natural products. **Ver Latinoamr Quim**, v. 21, p. 5–7, 1990.
- BAY-RICHTER, C. *et al.* Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 193–199, 12 set. 2011.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–87, nov. 1971.

BEAULIEU, J.-M.; ESPINOZA, S.; GAINETDINOV, R. R. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 1–23, jan. 2015.

BELUJON, P.; GRACE, A. A. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 12, p. 1036–1046, 2017.

BERK, M. Oxidative biology: new intervention opportunities in psychiatry. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 19, n. 4, p. 259–260, 2007.

BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BERTONI, M. *et al.* Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10480, dez. 2017.

BETTIO, L. E. B. Efeito tipo-antidepressivo da guanosina em diferentes modelos animais. 2016.

BHATTACHARYA, D. *et al.* 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. Web Server issue, p. W406–W409, 8 jul. 2016.

BIENERT, S. *et al.* The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313–D319, jan. 2017.

BLACK, C. N. *et al.* Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–75, 1 jan. 2015.

BLIER, P. *et al.* Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 861, p. 204–16, 15 dez. 1998.

BRAAT, S.; KOOY, R. F. The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. **Neuron**, v. 86, n. 5, p. 1119–1130, 3 jun. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BRAGA, S. L. **Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação de fármacos**. 2018.

BURKE, R. E.; GREENBAUM, D. Effect of postmortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 49, n. 2, p. 592–6, ago. 1987.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia

laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Rev Assoc Bras Psiquiatr**, v. 3, p. 25–31, 1979.

CARVALHO, A. M. R. DE. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (O-metil-N-2-hidroxi-benzoil tiramina) em modelos experimentais**. 2011.

CARVALHO, A. M. R. DE. **Estudo do mecanismo de ação da atividade antinociceptiva da Riparina II de Aniba riparia em camundongos**. 24 nov. 2016.

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

CATÃO, R. M. R. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli multirresistentes. **Rev. bras. anal. clin**, v. 37, n. 4, p. 247–249, 2005.

CHANCE, B.; MAEHLI, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. {black small square}. **Methods in Enzymology**, v. 2, n. C, p. 764–775, 1955.

CIPRIANI, A. *et al.* Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet**, v. 391, n. 10128, p. 1357–1366, 7 abr. 2018.

CLARK, G.; KOESTER, A. G.; PEARSON, D. W. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. **Psychopharmacologia**, v. 20, n. 2, p. 169–71, 1971.

COPLAN, J. D. *et al.* Treating comorbid anxiety and depression: Psychosocial and pharmacological approaches. **World Journal of Psychiatry**, v. 5, n. 4, p. 366, 22 dez. 2015.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–45, maio 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 326–357, 13 abr. 2004.

CSONKA, C. *et al.* Measurement of NO in biological samples. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 6, p. 1620–32, mar. 2015.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, maio 2017.

DE DEURWAERDÈRE, P.; DI GIOVANNI, G. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic systems: Therapeutic implications. **Progress in Neurobiology**, v. 151, p. 175–236, 1 abr. 2017.

DE SOUSA, F. C. F. *et al.* Antianxiety effects of riparin I from Aniba riparia (Nees) Mez

(Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 12, p. 1005–1008, 1 dez. 2005.

DE SOUSA, F. C. F. *et al.* Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1212–6, jul. 2007.

DE SOUSA, F. C. F. *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 95–103, 1 fev. 2014.

DE SOUSA, R. T. *et al.* Challenging Treatment-Resistant Major Depressive Disorder: A Roadmap for Improved Therapeutics. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 5, p. 616–35, 2015.

DIÁRIO DO NORDESTE. Ceará concede 4 auxílios-doença a cada 24h devido à depressão - Metro - Diário do Nordeste. **04 de abril de 2019**, abr. 2019.

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

DOWLATI, Y. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 1 mar. 2010.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421–31, 1990.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice\*\*College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, v. 46, n. 3, p. 208–209, mar. 1957.

ĐURAČKOVÁ, Z. Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts. In: **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 3–38.

FASICK, V. *et al.* The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 53, p. 139–159, 1 jun. 2015.

FELGER, J. C.; LOTRICH, F. E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199–229, 29 ago. 2013.

FERNANDES, P. A.; CARVALHO, M. R. DE. Alterações Neurobiológicas Verificadas a partir do Tratamento com Terapia Cognitivo-comportamental no Transtorno Obsessivo-Compulsivo. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 32, n. 2, 2016.

FIEDLER, E. P.; MARKS, M. J.; COLLINS, A. C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **Journal of neurochemistry**, v. 49, n. 3, p. 983–90, set. 1987.

FILE, S. E.; PELLOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of



anxiety and in the holeboard. **British journal of pharmacology**, v. 86, n. 3, p. 729–35, nov. 1985.

FRIESNER, R. A. *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6177–6196, out. 2006.

GAUTHIER, I.; NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 165, jan. 2015.

GAWRYLUK, J. W. *et al.* Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 01, p. 123–130, 16 fev. 2011.

GHANI, M. A. *et al.* Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, v. 230, p. 195–207, 1 set. 2017.

GHOSH, J. *et al.* Modeling ADMET. In: [s.l: s.n.]. p. 63–83.

GODLEWSKA, B. R.; NEAR, J.; COWEN, P. J. Neurochemistry of major depression: a study using magnetic resonance spectroscopy. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 3, p. 501–7, fev. 2015.

GOLDSMITH, D. R.; RAPAPORT, M. H.; MILLER, B. J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 12, p. 1696–1709, 23 dez. 2016.

GRACE, A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 524–32, 2016.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–8, out. 1982.

GREENWOOD, J. R. *et al.* Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 6–7, p. 591–604, jun. 2010.

HACIMUSALAR, Y.; EŞEL, E. Suggested Biomarkers for Major Depressive Disorder. **Noropsikiyatri arsivi**, v. 55, n. 3, p. 280–290, set. 2018.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179–1180, 1 abr. 2000.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 1 nov. 2007.

HAN, Q.-Q.; YU, J. Inflammation: a mechanism of depression? **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 3, p. 515–23, jun. 2014.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a

maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, ago. 1984.

HANNESTAD, J.; DELLAGIOIA, N.; BLOCH, M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 12, p. 2452–9, nov. 2011.

HASSAN BAIG, M. *et al.* Computer Aided Drug Design: Success and Limitations. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 5, p. 572–581, 26 jan. 2016.

HILL, B. G. *et al.* What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 26, p. 19699–704, 25 jun. 2010.

HIRSCHFELD, R. M. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, p. S12–S16, dez. 2014.

HUSSEIN, H. A. *et al.* PockDrug-Server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W436–W442, 1 jul. 2015.

JACOB, T. C.; MOSS, S. J.; JURD, R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 331–43, maio 2008.

JORDAN, W. *et al.* Oxidative stress in drug-naïve first episode patients with schizophrenia and major depression: effects of disease acuity and potential confounders. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 268, n. 2, p. 129–143, 2 mar. 2018.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13. ed. [s.l.: s.n.].

KOO, J. W. *et al.* Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2669–74, 9 fev. 2010.

LANDSBERG, L. Catecholamines. In: [s.l.] **Humana Press, Cham**, 2018. p. 1–14.

LAPIDUS, K. A. B. *et al.* In vivo 1H MRS study of potential associations between glutathione, oxidative stress and anhedonia in major depressive disorder. **Neuroscience Letters**, v. 569, p. 74–79, 21 maio 2014.

LEITE, C. P. **Avaliação dos efeitos farmacológicos de (O-Metil)-N-2-Hidroxi-Benzoil Tiramina (Riparina II) de Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos**. 2008.

LI, G.-B. *et al.* A combined molecular docking-based and pharmacophore-based target prediction strategy with a probabilistic fusion method for target ranking. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 44, p. 278–285, 1 jul. 2013.

- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–5, 1987.
- LIU, Y. *et al.* 5-HT<sub>1B</sub> autoreceptors differentially modulate the expression of conditioned fear in a circuit-specific manner. **Neuroscience**, v. 298, p. 436–447, 9 jul. 2015.
- LOPES, I. S. *et al.* Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 33–42, nov. 2018.
- 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 and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676–692, abr. 2011.
- MAES, M. *et al.* Generalized Anxiety Disorder (GAD) and Comorbid Major Depression with GAD Are Characterized by Enhanced Nitro-oxidative Stress, Increased Lipid Peroxidation, and Lowered Lipid-Associated Antioxidant Defenses. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 3, p. 489–510, 7 out. 2018.
- MANN, J. J. *et al.* ANXIETY IN MAJOR DEPRESSION AND CEREBROSPINAL FLUID FREE GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID: Research Article: CSF GABA, Anxiety and Major Depression. **Depression and Anxiety**, v. 31, n. 10, p. 814–821, out. 2014.
- MANTOVANI, M. **Estudo do mecanismo de ação antidepressiva e antinociceptiva da melatonina em camundongos.** 2003.
- MARATHE, S. V. *et al.* Effects of Monoamines and Antidepressants on Astrocyte Physiology: Implications for Monoamine Hypothesis of Depression. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 12, p. 117906951878914, 23 jan. 2018.
- MARQUES, A. D. S. *et al.* Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III. **Journal of molecular structure**, v. 753, n. 1–3, p. 13–21, 2005.
- MELO, C. T. V. DE. **Estudo dos efeitos farmacológicos de (O-METIL)-N-2,6-Dihidroxi-benzoil Tiramina (Riparina III) de Aniba Riparia (NEES) mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.** 2006.
- MELO, C. T. V. DE *et al.* Anxiolytic-Like Effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451–4, mar. 2006.
- MELO, C. T. V. DE. **Investigação do efeito antidepressivo da riparina III : alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo.** 29 abr. 2013.
- MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22–34, 1 jan. 2016.
- MORRIS, G. *et al.* The Glutathione System: A New Drug Target in Neuroimmune Disorders.

**Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 3, p. 1059–1084, 22 dez. 2014.

NAFFAA, M. M. *et al.* GABA- $\rho$  receptors: distinctive functions and molecular pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 1881–1894, 1 jul. 2017.

NASCIMENTO, O. *et al.* Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1757, 21 dez. 2016a.

NASCIMENTO, O. A. *et al.* Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1757, 21 dez. 2016b.

NAUTIYAL, K. M. *et al.* A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 12, p. 2941–2950, 29 nov. 2016.

NEUMAIER, J. F.; EDWARDS, E.; PLOTSKY, P. M. 5-HT(1B) mrna regulation in two animal models of altered stress reactivity. **Biological psychiatry**, v. 51, n. 11, p. 902–8, 1 jun. 2002.

NG, A. *et al.* IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12050, 13 dez. 2018.

OGAWA, S.; TSUCHIMINE, S.; KUNUGI, H. Cerebrospinal fluid monoamine metabolite concentrations in depressive disorder: A meta-analysis of historic evidence. **Journal of Psychiatric Research**, v. 105, p. 137–146, out. 2018.

OLIVEIRA, D. C. *et al.* Avaliação da Depressão em Funcionários de uma Instituição de Ensino Superior Particular em Vitória da Conquista – BA. **Id on Line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 11, n. 35, p. 392–404, 28 maio 2017.

OLIVEIRA, I. C. M. **Efeitos centrais da riparina I de aniba riparia (NEES) MEZ (LAURACEAE) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos.** 2012.

OLIVIER, J. D. A. *et al.* Sexual Dysfunction, Depression and Antidepressants: A Translational Approach. In: **Sexual Dysfunction**. [s.l.] InTech, 2017.

OPAS/OMS. **Depressão é tema de campanha da OMS para o Dia Mundial da Saúde de 2017.** Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5321:depressao-e-tema-de-campanha-da-oms-para-o-dia-mundial-da-saude-de-2017&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5321:depressao-e-tema-de-campanha-da-oms-para-o-dia-mundial-da-saude-de-2017&Itemid=839). Acesso em: 18 set. 2018.

OPAS/OMS. **Folha informativa - Depressão.** Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=822](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=822). Acesso em: 30 set. 2018.

OPS/OMS. **Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2016.** [s.l: s.n.].

- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, jan. 2007.
- PALTA, P. *et al.* Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. **Psychosomatic medicine**, v. 76, n. 1, p. 12–9, jan. 2014.
- PANDYA, C. D.; HOWELL, K. R.; PILLAI, A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 214–223, 2013.
- PATEL, H. *et al.* Target Fishing by Cross-Docking to Explain Polypharmacological Effects. **ChemMedChem**, v. 10, n. 7, p. 1209–1217, jul. 2015.
- PELLOW, S. *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, ago. 1985.
- PENG, C.-H. *et al.* Neuroprotection by Imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 128–140, fev. 2008.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 229, n. 2, p. 327–336, out. 1977.
- POSTAL, M.; APPENZELLER, S. The importance of cytokines and autoantibodies in depression. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 1, p. 30–35, 1 jan. 2015.
- PYTKA, K. *et al.* The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 2, p. 263–274, abr. 2016.
- RAISON, C. L.; KNIGHT, J. M.; PARIANTE, C. Interleukin (IL)-6: A good kid hanging out with bad friends (and why sauna is good for health). **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 73, p. 1–2, 1 out. 2018.
- RANG, H. P. *et al.* **Rang and Dale's pharmacology**. 8a Edição ed. [s.l.: s.n.].
- REIS, L. C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 2, p. 261–283, jun. 2007.
- RICHARDSON-JONES, J. W. *et al.* Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 16, p. 6008–18, 20 abr. 2011.
- RUF, B. M.; BHAGWAGAR, Z. The 5-HT<sub>1B</sub> receptor: a novel target for the pathophysiology of depression. **Current drug targets**, v. 10, n. 11, p. 1118–38, nov. 2009.
- SALAMONE, J. D. *et al.* The pharmacology of effort-related choice behavior: Dopamine, depression, and individual differences. **Behavioural Processes**, v. 127, p. 3–17, 1 jun. 2016.
- SCHAIRER, D. O. *et al.* Evaluation of the antibiotic properties of glutathione. **Journal of**

**drugs in dermatology : JDD**, v. 12, n. 11, p. 1272–7, nov. 2013.

SCHENKEL, M. *et al.* Interação medicamentosa em usuários de antidepressivos do sistema público de um município do sul do Brasil. **Ciência & Saúde**, v. 8, n. 3, p. 107, 21 jan. 2016.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current biology : CB**, v. 24, n. 10, p. R453-62, 19 maio 2014.

SCHMIDT, N.; FERGER, B. The biogenic trace amine tyramine induces a pronounced hydroxyl radical production via a monoamine oxidase dependent mechanism: an in vivo microdialysis study in mouse striatum. **Brain Research**, v. 1012, n. 1–2, p. 101–107, 25 jun. 2004.

SCHNEIDER, G. Virtual screening: an endless staircase? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 4, p. 273–276, 1 abr. 2010.

SCHOENFELD, T. J. *et al.* Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 12, p. 914–923, 15 dez. 2017.

SCHREIBELT, G. *et al.* Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. **Brain Research Reviews**, v. 56, n. 2, p. 322–330, dez. 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 24 out. 1968.

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

SEKI, K.; YOSHIDA, S.; JAISWAL, M. Molecular mechanism of noradrenaline during the stress-induced major depressive disorder. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 7, p. 1159, jul. 2018.

SHELLEY, J. C. *et al.* Epik: a software program for pK<sub>a</sub> prediction and protonation state generation for drug-like molecules. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 12, p. 681–691, dez. 2007.

SHEYNKMAN, G. M. *et al.* Proteogenomics: Integrating Next-Generation Sequencing and Mass Spectrometry to Characterize Human Proteomic Variation. **Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 9, n. 1, p. 521–45, 2016.

SIGMA-ALDRICH. **Tyramine**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/t90344?lang=en&region=US>. Acesso em: 19 nov. 2018.

SIVILOTTI, M. L. A. Flumazenil, naloxone and the 'coma cocktail'. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 428–436, mar. 2016.

SIWEK, M. *et al.* Oxidative stress markers in affective disorders. **Pharmacological reports : PR**, v. 65, n. 6, p. 1558–71, 2013.

SOARES, C. S. M. **Mecanismos neuronais e tratamento farmacológico na perturbação da ansiedade generalizada em adultos.** 2017.

SOUSA, R. D. DE *et al.* Anxiety and Depression in the Portuguese Older Adults: Prevalence and Associated Factors. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 196, 20 nov. 2017.

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

SOUSA, F. C. F. *et al.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642–654, dez. 2008.

SOUZA, F. C. B. DE. **Ansiedade, depressão e qualidade de vida em mulheres usuárias de contraceptivos hormonais orais.** 28 set. 2017.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia. Bases neurocientíficas e aplicações práticas.** 4ª ed. [s.l.: s.n.].

STANDAERT, D.; GALANTER, J. M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatologia da Farmacoterapia**, p. 166–185, 2009.

STERU, L. *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–70, 1985.

STRAWBRIDGE, R. *et al.* Inflammation and clinical response to treatment in depression: A meta-analysis. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1532–1543, 1 out. 2015.

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 & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 129–137, abr. 2013.

THOMAS, G. *et al.* Studies on the Mechanism of Spasmolytic Activity of (O-Methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, 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, n. 2, p. 103–107, 1994.

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

VASCONCELOS, L. **Efeito antinociceptivo da Riparina III (n-2,6-dihidroxibenzoil o-metil-tiramina) em camundongos: possíveis mecanismos farmacológicos.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2015.

VASCONCELOS, L. F. **Efeito antinociceptivo da riparina iii (n-2,6-dihidroxibenzoil o-metil-tiramina) em modelos animais de nocicepção: possíveis mecanismos envolvidos.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2015.

VIANA, G. S. DE B. *et al.* The monoaminergic pathways and inhibition of monoamine transporters interfere with the antidepressive-like behavior of ketamine. **IBRO Reports**, v. 4, p. 7–13, jun. 2018.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 35, n. 5, p. 196–204, 2008.

WACKER, D. *et al.* Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6132, p. 615–9, 3 maio 2013.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, jul. 2018.

WATERHOUSE, B. D.; NAVARRA, R. L. The locus coeruleus-norepinephrine system and sensory signal processing: A historical review and current perspectives. **Brain Research**, 1 set. 2018.

WHO. WHO | Depression and Other Common Mental Disorders. **WHO**, 2017.

YANG, C.; VALERIO, L. G.; ARVIDSON, K. B. Computational toxicology approaches at the US Food and Drug Administration. **Alternatives to laboratory animals : ATLA**, v. 37, n. 5, p. 523–31, nov. 2009.

YOHN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 28, 24 dez. 2017.

ZITKA, O. *et al.* Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. **Oncology letters**, v. 4, n. 6, p. 1247–1253, dez. 2012.



## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 68/2014, sobre o projeto intitulado: “**ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA RIPARINA IV EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS**” de responsabilidade da Profª. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 07 de agosto de 2014.

Fortaleza, 07 de agosto de 2014

Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profª. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
MAY SAFELING

## ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA RIPARINA IV EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS.”**, protocolo N°72/17, sob responsabilidade de 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, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 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 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 21 de setembro de 2017.

Vigência do projeto	01/10/2018 a 31/12/2018
Espécie/Linhagem	Camundongos heterogênicos Swiss – 285 Camundongos heterogênico swiss - 15
Nº de Animais	300
Peso/idade	16-22 g 4-8 semanas
Sexo	285 – Machos e 15 Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 22 de setembro de 2017

Coordenador do CEUA UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
ALEXANDRE HAVT BINDÁ  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1000002

## ANEXO C – CERTIFICADO REVISÃO DO INGLÊS

### CERTIFICATE OF ENGLISH EDITING

This document certifies that the paper listed below has been edited to ensure that the language is clear and free of errors. The edit was performed by professional editors at Editage, a division of Cactus Communications. The intent of the author's message was not altered in any way during the editing process. The quality of the edit has been guaranteed, with the assumption that our suggested changes have been accepted and have not been further altered without the knowledge of our editors.

#### TITLE OF THE PAPER

INVOLVEMENT OF THE MONOAMINERGIC SYSTEM AND OXIDATIVE STRESS IN THE ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF RIPARIN IV IN MICE

#### AUTHORS

NATALIA FERREIRA DE OLIVEIRA

#### JOB CODE

NURTO\_1



Signature

Vikas Narang,  
Senior Vice President,  
Operations-Author Services, Editage

Date of Issue  
January 12, 2019

Editage, a brand of Cactus Communications, offers professional English language editing and publication support services to authors engaged in over 500 areas of research. Through its community of experienced editors, which includes doctors, engineers, published scientists, and researchers with peer review experience, Editage has successfully helped authors get published in internationally reputed journals. Authors who work with Editage are guaranteed excellent language quality and timely delivery.



**CACTUS**

#### Contact Editage

##### Worldwide

request@editage.com

+1 877-334-8243

www.editage.com

##### Japan

submissions@editage.com

+81 03-6868-3348

www.editage.jp

##### Korea

submit-

korea@editage.com

1544-9241

www.editage.co.kr

##### China

fabiao@editage.cn

400-005-6055

www.editage.cn

##### Brazil

contato@editage.com

0800-892-20-97

www.editage.com.br

##### Taiwan

submitjobs@editage.com

02 2657 0306

www.editage.com.tw