



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

ALANA GOMES DE SOUZA

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO DIMETIL FUMARATO EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL:
ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS ASTROCÍTICOS E MICROGLIAIS**

FORTALEZA

2022

ALANA GOMES DE SOUZA

EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO DIMETIL FUMARATO EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL:
ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS ASTROCÍTICOS E MICROGLIAIS

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

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

FORTALEZA

2022

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)

- D32e de Souza, Alana Gomes.
Efeito antidepressivo do dimetil fumarato em camundongos submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível : envolvimento de mecanismos astrocíticos e microgliais / Alana Gomes de Souza. – 2022.
89 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Marta Maria de França Fonteles.
1. Depressão. 2. Inflamação Neurogênica. 3. Fumarato de Dimetilo. 4. Astrócitos. 5. Microglia. I. Título.
CDD 615.1

ALANA GOMES DE SOUZA

EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO DIMETIL FUMARATO EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL:
ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS ASTROCÍTICOS E MICROGLIAIS

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

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Profa. Dra. Jamile Magalhaes Ferreira
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Cicero Francisco Bezerra Felipe.
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

À minha mãe, por ser sempre a minha maior
incentivadora e sonhar os meus sonhos junto
comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar mais essa conquista na minha vida, sempre realizando bem mais do que pedi ou sonhei.

Aos meus pais Elizabete e Nedes, por todo amor, dedicação e por todas as renúncias que fizeram por mim. Mãezinha, sua garra e coragem foram fatores determinantes para eu chegar onde cheguei. Paizinho, obrigada por todo apoio e cuidado de sempre. Amo muito vocês!

A toda minha família, minha irmã Aline, meus avós, meus tios e tias. Vocês são a minha base e são fundamentais para eu ser o ser humano que sou hoje. Obrigada por me incentivarem e me apoiarem sempre.

À professora Dra. Marta Maria de França Fonteles. Como digo a todos, ela é bem mais que uma orientadora para mim, é uma amiga pela qual tenho muito carinho e admiração. Agradeço por me acompanhar nessa jornada acadêmica há onze anos e espero que possamos continuar na jornada da vida sempre unidas, mesmo que não seja fisicamente.

Aos professores participantes da banca examinadora, Profa. Dra. Cléa Florenço, Profa. Dra. Jamile Magalhães, Prof. Dr. Tiago Sampaio e Prof. Dr. Cicero Felipe, pelo tempo despendido para ler o trabalho e pelas valiosas colaborações e sugestões a fim de torná-lo ainda melhor.

À minha dupla Iardja. Amiga, obrigada por tudo que fez por mim, pelo suporte que me deu quando precisei mudar de estado, sem você este trabalho não teria sido possível.

Aos meus companheiros do Laboratório de Neurofarmacologia. Adriano, uma das minhas maiores inspirações acadêmicas, obrigada por toda ajuda, desde a elaboração do projeto até a execução dos experimentos. Michele Jales, Talita, Klistenes, João Victor, Paloma, Michelle Verde, Cid e Leonardo, obrigada pelos dias de convívio nos quais aprendemos muito juntos e partilhamos angústias e dificuldades, mas também experiências e sorrisos.

Às Professoras Carolina Horta e Melina Mottin, que me acolheram no LabMol da Universidade Federal de Goiás, onde obtivemos os resultados computacionais deste trabalho. Foi um grande desafio aprender sobre esta área, que era totalmente nova para mim. Obrigada por todo o conhecimento repassado e por toda solicitude sempre que precisei.

A todos os meus amigos, os que carrego comigo desde a infância, os que conheci na faculdade e no trabalho. Vocês acreditaram em mim até quando eu mesma não acreditava. Mateus, obrigada por todo suporte e incentivo durante a elaboração deste trabalho. Renato e Flávio, meus chefes, obrigada por estimularem meu desenvolvimento profissional e por me

ajudarem sempre que possível.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro nos primeiros meses desta pesquisa.

RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma condição psiquiátrica de alta prevalência mundial. Muitos pacientes não são responsivos à farmacoterapia convencional moduladora do sistema monoaminérgico e, mesmo os que são responsivos, apresentam efeitos adversos variados. O dimetil fumarato (DMF) é um ativador da via do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que possui efeitos antioxidante e anti-inflamatório. Como diversos estudos demonstram o envolvimento da inflamação na fisiopatologia do TDM, o estudo do DMF nesse contexto mostra-se promissor. Dessa forma, o presente trabalho se propõe a investigar o efeito do dimetil fumarato na neuroinflamação através do modelo de depressão induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI). Para isso, camundongos machos foram expostos a eventos estressores durante 28 dias e a partir do 14º dia receberam DMF nas doses de 50 e 100 mg/kg ou fluoxetina 10 mg/kg ou veículo, via oral; um grupo não passou pelo ECI, para ser usado como controle. No 29º dia, os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliar a atividade locomotora (Campo Aberto), comportamentos depressivo-símiles (Nado forçado, Preferência pela sacarose) e a performance cognitiva (Labirinto em Y e Reconhecimento do Objeto Novo) e, em seguida, tiveram seus cérebros dissecados. Foram avaliadas as expressões de marcadores de micróglia e astrócitos, através de análises de imunofluorescência e dosadas as citocinas TNF- α e IL-1 β , por ensaio imunoenzimático, no hipocampo. Além disso, estratégias computacionais como predição de alvos, modelagem molecular e cálculos de *docking* sugeriram a proteína Kelch 1 associada a ECH (Keap1) e o receptor de ácido hidroxicarboxílico 2 (HCAR2) como prováveis alvos do monometil fumarato (metabólito ativo do DMF). O ECI induziu comportamentos ansiogênico e depressivo-símiles, déficit cognitivo, expressão reduzida do marcador de astrócitos e expressões aumentadas do marcador de micróglia e das citocinas TNF- α e IL-1 β no hipocampo. Essas alterações foram revertidas pelo tratamento com DMF. Dessa forma, sugere-se que um dos mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do DMF é a supressão neuroinflamatória, através da via de sinalização HCAR2. No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de aprofundar e melhor compreender os mecanismos moleculares deste fármaco.

Palavras-chave: Depressão. Inflamação Neurogênica. Fumarato de Dimetilo. Astrócitos. Microglia.

ABSTRACT

ANTIDEPRESSIVE EFFECT OF DIMETHYL FUMARATE IN MICE SUBMITTED TO CHRONIC UNPREDICTABLE MILD STRESS MODEL: INVOLVEMENT OF ASTROCYTIC AND MICROGLIAL MECHANISMS

Major Depressive Disorder (MDD) is a highly prevalent psychiatric condition. Many patients are not responsive to conventional pharmacotherapy that modulates the monoaminergic system and even those who are responsive have various adverse effects. Dimethyl fumarate (DMF) is an activator of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway, which has antioxidant and anti-inflammatory effects. As several studies demonstrate the involvement of inflammation in the pathophysiology of MDD, the study of DMF in this context shows promising. Thus, the present work aims to investigate the effect of dimethylfumarate on neuroinflammation through the depression model induced by Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS). For this, male mice were exposed to stressful events for 28 days and from the 14th day they received DMF in the doses of 50 and 100 mg / kg or fluoxetine 10 mg / kg or saline, orally; one group was not submitted to CUMS, to be used as a control. On the 29th day, the animals were subjected to behavioral tests to assess locomotor activity (Open Field), depressive-like behavior (Forced swimming, Sucrose preference) and cognitive performance (Y-Maze and Novel Object Recognition) and then had their brains dissected. Microglia and astrocyte markers expressions were evaluated through immunofluorescence analysis and the cytokines TNF- α and IL-1 β were measured by immunoenzymatic assay in hippocampus. In addition, we performed target prediction, molecular modeling and *docking* calculations that suggest Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) and Hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCAR2) as the probable targets of monomethyl fumarate (DMF active metabolite). CUMS induced anxiety- and depressive-like behaviors, cognitive deficit, decreased astrocyte marker and increased microglia marker, TNF- α and IL-1 β expression in the hippocampus. These alterations were reversed by DMF. Thus, it is suggested that one of the mechanisms involved in the antidepressant effect of DMF is neuroinflammatory suppression through the HCAR2 signaling pathway. However, more studies must be carried out in order to better understand the molecular mechanisms of this drug.

Keywords: Depression. Neurogenic Inflammation. Dimethyl Fumarate. Astrocytes. Microglia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas químicas do dimetil fumarato (DMF) e do seu metabólito monometil fumarato (MMF).....	21
Figura 2 – Mecanismo de ação do Nrf2	22
Figura 3 - Arquitetura de domínio das proteínas Keap1 e Nrf2	23
Figura 4 - Delineamento experimental	29
Figura 5 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI.....	36
Figura 6 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao ECI.	37
Figura 7 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a preferência pela sacarose em camundongos submetidos ao ECI.	38
Figura 8 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y, em camundongos submetidos ao ECI.	39
Figura 9 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI.	40
Figura 10 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o ganho de peso em camundongos submetidos ao ECI.	41
Figura 11 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão da proteína glial fibrilar ácida em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.	42
Figura 12 - Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão do marcador de ativação microglial Iba1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI. .	45
Figura 13 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a concentração de TNF- α e IL-1 β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.	49
Figura 14 - Gráfico de Ramachandran do modelo HCAR2.	54
Figura 15 - Modo de ligação predito através de docking molecular entre o MMF e a proteína HCAR2.	55
Figura 16 - Modo de ligação previsto entre o MMF e o domínio Kelch de Keap1	57
Figura 17 - Modo de ligação previsto entre o MMF e o domínio BTB de Keap1	58
Figura 18 - Alinhamento do MMF- Keap1 / Kelch com o cristal DMF- Keap1 / Kelch	59
Figura 19 - Cascata de sinalização HCAR2/SIRT1/Nrf2	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK - Proteína Cinase Ativada por Monofosfato de Adenosina

ANOVA – Análise de Variância

ARE - Elementos de Resposta Antioxidante

BTB - Tramtrack e Bric à brac

CA - *Cornu Ammonis*

DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DG - Giro Dentado

DMF - Dimetil fumarato

EAE - Encefalomielite Autoimune Experimental

ECI - Estresse Crônico Imprevisível

EPM – Erro Padrão da Média

FLU – Fluoxetina

GFAP - Proteína Glial Fibrilar Ácida

GLAST - Transportador de glutamato-aspartato

GLT1 - Transportador de glutamato

GST - Glutathione S-transferase

HCAR2 - Receptor de ácido hidroxicarboxílico 2

HO-1 - Heme oxigenase 1

Iba1 - Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1

IKK β - Inibidor do fator nuclear kappa-B cinase subunidade beta

IL-1 - Interleucina-1

IL-6 - Interleucina-6

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível

Keap1 - Proteína Kelch 1 associada a ECH

MMF - Monometil fumarato

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NO - Óxido Nítrico

NOR - Reconhecimento do Objeto Novo

NQO-1 - NADPH quinina oxidoreductase 1

Nrf2 - Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

PDB - *Protein Data Bank*

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

ROS - Espécies reativas de oxigênio
SEA - *Similarity Ensemble Approach*
SIRT1 – Sirtuína-1
SNC – Sistema Nervoso Central
TDM - Transtorno Depressivo Maior
TNF- α - Fator de necrose tumoral- α
VEI - Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Aspectos gerais do TDM	14
1.2	Fisiopatologia e farmacoterapia do TDM	14
1.3	Inflamação, microglia e citocinas	16
1.4	Astrócitos	18
1.5	Modelo de depressão induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível	19
1.6	Dimetil fumarato e a via Nrf2	20
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	Animais	27
4.2	Drogas	27
4.3	Protocolo de Estresse Crônico Imprevisível	27
4.4	Delineamento experimental	28
4.5	Testes <i>in vivo</i>	29
4.5.1	<i>Teste do Campo Aberto</i>	29
4.5.2	<i>Teste do Nado Forçado</i>	30
4.5.3	<i>Teste de preferência pela sacarose (PPS)</i>	30
4.5.4	<i>Labirinto em Y</i>	30
4.5.5	<i>Reconhecimento do objeto novo (NOR)</i>	31
4.6	Testes <i>ex vivo</i>	31
4.6.1	<i>Imunofluorescência</i>	32
4.6.2	<i>Ensaio imunoenzimático</i>	32
4.7	Análise Estatística	33
4.8	Testes <i>in silico</i>	33
4.8.1	<i>Predição de Alvo</i>	33
4.8.2	<i>Modelagem baseada em alvo</i>	33
4.8.3	<i>Cálculos de Docking Molecular</i>	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Testes <i>in vivo</i>	35
5.1.1	<i>Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a atividade</i>	

<i>locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI.....</i>	<i>35</i>
<i>5.1.2 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao ECI.....</i>	<i>37</i>
<i>5.1.3 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a preferência pela sacarose em camundongos submetidos ao ECI.....</i>	<i>37</i>
<i>5.1.4 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y em camundongos submetidos ao ECI.....</i>	<i>38</i>
<i>5.1.5 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI.</i>	<i>39</i>
<i>5.1.6 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o ganho de peso em camundongos submetidos ao ECI.</i>	<i>40</i>
<i>5.2 Testes ex vivo</i>	<i>41</i>
<i>5.2.1 Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão de GFAP em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.....</i>	<i>41</i>
<i>5.2.2 Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão de Iba1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.....</i>	<i>45</i>
<i>5.2.3 Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a concentração de TNF-α e IL-1β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.....</i>	<i>48</i>
<i>5.3 Testes in silico.....</i>	<i>51</i>
<i>5.3.1 Predição de Alvo</i>	<i>51</i>
<i>5.3.2 Modelagem baseada no alvo</i>	<i>53</i>
<i>5.3.3 Docking molecular</i>	<i>54</i>
<i>5.3.3.1 MMF-HCAR2.....</i>	<i>54</i>
<i>5.3.3.2 MMF-Keap1</i>	<i>55</i>
<i>5.3.3.3 Eficiência dos ligantes.....</i>	<i>58</i>
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do TDM

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma condição psiquiátrica comum e tem sido a principal causa de incapacidade e morte prematura no mundo. Globalmente, mais de 264 milhões de pessoas têm TDM, sendo mais prevalente em mulheres que em homens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Um recente estudo verificou que, no Brasil, durante a pandemia por COVID-19, 40,4% dos indivíduos entrevistados se sentiram frequentemente tristes ou deprimidos, 52,6% ansiosos ou nervosos e 43,5% relataram início de problemas de sono. Esses sintomas foram mais presentes entre adultos jovens, mulheres e pessoas com antecedente de depressão. As elevadas prevalências encontradas indicam a necessidade de garantir a provisão de serviços de atenção à saúde mental adaptados ao contexto pandêmico (BARROS et al., 2020).

Conforme definido na quinta edição do *Manual Diagnóstico e Estatístico* (DSM-5), o TDM está associado à perda de prazer e presença de humor deprimido durante a atividade social, bem como a mudanças no sono, energia, concentração e apetite, durante um período de no mínimo duas semanas (VERHOOF et al., 2013). Esse distúrbio prejudica a produtividade dos indivíduos afetados e aumenta significativamente a frequência de tentativas de suicídio (KIYOHARA; YOSHIMASU, 2009). Estima-se que 85 a 90% das mortes por suicídio ocorreram em indivíduos com desordem psiquiátrica diagnosticável, sendo a maioria depressão severa (CHARNEY; MANJI, 2004).

Quanto à etiologia dessa doença, acredita-se que seja resultado de anormalidades celulares moleculares que interagem com fatores genéticos e ambientais (KRISHNAN; NESTLER, 2008). O estresse é visto como o principal fator ambiental descrito na predisposição dos indivíduos ao TDM (ANDREWS et al., 2011). Um estudo mostrou que 88,1% dos pacientes tinham o TDM diagnosticado após algum evento estressante, enquanto apenas 11,9% pareciam apresentar etiologia endógena, ou seja, o episódio depressivo ocorreu sem algum engatilhador ambiental (KELLER; NEALE; KENDLER, 2007).

1.2 Fisiopatologia e farmacoterapia do TDM

Embora venha sendo estudada há anos, a base neurobiológica do TDM ainda

não é totalmente elucidada (FU et al., 2012). Diversas hipóteses foram consideradas como mecanismos fisiopatológicos deste, destacando-se a deficiência de monoaminas (NUTT, 2008), predisposição genética e influência de fatores ambientais (BONDY; ZILL, 2004), alterações na função do receptor e fator neurotrófico (PITTENGER; DUMAN, 2008), disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (CARROLL et al., 2007), desregulação da via do óxido nítrico (MANTOVANI et al., 2003), neuroinflamação (MAES et al., 2011), estresse oxidativo (NG et al., 2008) e disfunção glutamatérgica (SANACORA et al., 2008).

Estudos anteriores relataram que o hipocampo é uma das regiões cerebrais mais intimamente associadas à regulação de transtornos mentais, como ansiedade e depressão (CINTRA et al., 2012; FAROOQ et al., 2012). Além disso, achados sugerem que a redução da neurogênese no hipocampo, principalmente no giro dentado, é uma característica comum de vários tipos de estresse, incluindo o Estresse Crônico Imprevisível (ECI) (GARZA et al., 2012; TROUBAT et al., 2021), desta forma, esta foi a área cerebral escolhida para o presente estudo.

A teoria clássica sobre a bioquímica da depressão considera a hipótese de que há um déficit funcional dos neurotransmissores monoaminérgicos, como serotonina e noradrenalina em certos locais do cérebro (RANG; DALE, 2007). Originalmente, a teoria era baseada em evidências de que antidepressivos que reforçavam transmissões monoaminérgicas eram efetivos em atenuar os sintomas da doença e certas drogas que reduziam estes neurotransmissores poderiam induzir a doença (STAHL, 2008).

Até hoje, quase todos os medicamentos disponíveis para o tratamento de TDM têm sido desenvolvidos a partir do déficit monoaminérgico. Embora essa abordagem tenha levado a grandes avanços no tratamento do TDM, as limitações dessas drogas antidepressivas estão se tornando cada vez mais evidentes (INSEL; SAHAKIAN, 2012; KHAN et al., 2012; RUSH et al., 2006).

Cerca de 33% dos pacientes não respondem adequadamente à terapêutica farmacológica convencional (GAYNES et al., 2009) e, mesmo os pacientes responsivos, apresentam efeitos adversos variados e desagradáveis, como sedação, incapacidade física para determinadas atividades, náuseas, insônia e perda de peso (OTTE et al., 2016), que podem levar à interrupção da terapia. Além disso, apenas 27% dos pacientes alcançam remissão dentro de 12 semanas (GAYNES et al., 2009) e, de modo contrário ao que se espera de terapias para uma condição associada ao suicídio, estudos sugerem que maior risco de suicídio ou comportamento suicida está associado aos antidepressivos mais utilizados (CIPRIANI; BARBUI; GEDDES, 2005; LICINIO; WONG, 2005).

Um grande obstáculo para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes tem

sido o entendimento limitado da fisiopatologia do TDM. Esse fator somado aos problemas de eficácia e de segurança dos antidepressivos moduladores do sistema monoaminérgico, nos leva a buscar entender o papel de outros sistemas na doença.

O estresse, físico e/ou psicológico, aumenta a ocorrência de comportamentos depressivos, mediante alterações em mecanismos hormonais e bioquímicos. Dessa forma, evidências indicam uma forte relação entre depressão e inflamação (GAŁECKI; TALAROWSKA, 2018). O Estresse Crônico Imprevisível (ECI) é um modelo validado de depressão, que ao induzir neuroinflamação em regiões sensíveis ao estresse no cérebro de camundongos leva a efeito semelhante ao de outras substâncias potencialmente neuroinflamatórias. Este modelo não apenas apóia a hipótese inflamatória da depressão, mas também fornece mais evidências de sua força como um paradigma experimental (FAROOQ et al., 2012).

1.3 Inflamação, microglia e citocinas

Um fator importante na produção de dano neuronal é a neuroinflamação, que está associada a várias doenças neurológicas (OH et al., 2012). A inflamação demonstrou desempenhar um papel crítico na patogênese da depressão, embora os mecanismos fisiopatológicos não sejam totalmente compreendidos (DOWLATI et al., 2010).

Estudos anteriores indicaram que níveis aumentados de fatores pró-inflamatórios, incluindo interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (ROS) estão presentes em pacientes com transtorno depressivo maior (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005; SONG et al., 2009). Esses resultados sugerem que a ativação das vias inflamatórias pode representar um componente significativo na fisiopatologia do TDM (RAWDIN et al., 2013). Portanto, uma caracterização detalhada dos mecanismos moleculares subjacentes a esses processos inflamatórios em fenótipos de depressão pode fornecer *insights* promissores sobre abordagens terapêuticas que visam déficits específicos que resultam em depressão.

Dados clínicos e pré-clínicos sugerem que a depressão está associada à inflamação (DANTZER et al., 2011). Dowlati e colaboradores (2010), em uma metanálise, demonstraram que pacientes deprimidos apresentam aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6.

Dessa forma, a neuroinflamação é demonstrada como um fator-chave do transtorno depressivo maior e pode levar a este através da ativação de mecanismos complexos

como: mudanças na neurotransmissão de monoaminas e glutamato, desregulação do eixo HPA e alteração da produção de neurônios e células gliais no giro dentado do hipocampo (TROUBAT et al., 2021).

Neuroinflamação pode ser evidenciada pela presença de microglia ativada e astrócitos reativos no parênquima cerebral, que levam à produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RANSOHOFF; PERRY, 2009). A inflamação pode causar a liberação de NF- κ B (fator de transcrição nuclear kappa B) de I κ B e estimular a translocação nuclear de NF- κ B para modular a resposta transcricional (NAIR et al., 2008).

As células microgлияis compartilham uma origem comum com macrófagos periféricos, ao contrário de outras células cerebrais, e têm um forte capacidade regenerativa para manter números suficientes para desempenhar suas funções (CZECH; GRESSENS; KAINDL, 2011). Essas células passam para o fenótipo ativado (ou seja, microglia M1), em que há estímulo a secreção de quimiocinas e citocinas (LUSARCZYK et al., 2018), como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), bem como óxido nítrico sintase induzível e ciclooxigenase (COX) (LIVELY; SCHLICHTER, 2018). As células microgлияis também recrutam microglia adicional ao local da infecção ou dano cerebral para uma resposta mais eficiente (KUMAR, 2019). O outro fenótipo da microglia, chamado microglia M2, evita danos induzidos por M1 e neurotoxicidade. O fenótipo M2 é induzido por meio da captação de células apoptóticas ou exposição a resíduos de mielina, bem como por citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-10 e fator de crescimento transformador - TGF). As células M2 promovem antiinflamação, reparação de tecidos e reconstrução extracelular, bem como neurogênese (YUAN et al., 2017).

A confirmação de que a microglia ativada está associada à depressão foi obtida primeiramente em estudos com animais. Foi mostrado que CD11b, conhecido por ser expresso por células imunidade periférica e microglia, é aumentado em várias estruturas cerebrais implicando na depressão, como o hipocampo e amígdala, em camundongos expostos a estresse crônico imprevisível (FAROOQ et al., 2012). Além disso, a depressão grave foi associada a aumento microglial no giro cingulado anterior de pacientes deprimidos (BUSSE et al., 2015).

A microglia não apenas defende contra insultos neuronais, mas também medeia os efeitos neurobiológicos do estresse (HINWOOD et al., 2012). A molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (Iba1) é expressa exclusivamente em células de linhagem monocítica e é, portanto, amplamente utilizada como um marcador para microglia /

macrófagos no cérebro e outros tecidos (ITO et al., 1998). Iba1 pode remodelar o citoesqueleto de actina e contribuir para alterações morfológicas que se correlacionam a vários estados microgliais (KANAZAWA et al., 2002).

1.4 Astrócitos

Dos três tipos de células gliais (ou seja, astrócitos, oligodendrócitos, microglia) do sistema nervoso central, os astrócitos são considerados o tipo de célula mais numeroso em mamíferos (SOFRONIEW; VINTERS, 2010) e os marcadores astrocíticos mais comumente usados são a Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), S100B, Aqua-porin 4, transportador de glutamato-aspartato (GLAST) e transportador de glutamato (GLT1) (HEWETT, 2009).

Os astrócitos tem função estrutural, servindo como suporte para os neurônios, e expressam canais dependentes de voltagem e vários receptores de neurotransmissores (KIMELBERG, 2010). Além disso, os processos astrocíticos envolvem conexões sinápticas e, por isso, não apenas as isolam, mas modulam ativamente a transmissão sináptica como um terceiro membro da chamada "sinapse tripartite" (PEREA; NAVARRETE; ARAQUE, 2009). Os astrócitos também exercem controle significativo sobre a formação de sinapses, neurogênese adulta e tônus vascular (EROGLU; BARRES, 2010; KIMELBERG, 2010).

Os astrócitos estão ativamente envolvidos na recaptação, metabolismo e reciclagem de glutamato. Os níveis de glutamato são regulados pela sua remoção do espaço extracelular através dos transportadores de aminoácidos excitatórios 1 e 2 (EAAT-1 e EAAT-2) em humanos, que em roedores são conhecidos respectivamente como GLAST e GLT-1, que ficam localizados nos astrócitos, onde o glutamato é então convertido em glutamina através da ação da Glutamina Sintetase. A glutamina é então transportada de volta para o neurônio glutamatérgico onde é hidrolisada pela glutaminase de volta a glutamato (FURUTA et al., 2005; SANACORA et al., 2008). Assim, astrócitos desempenham um papel crítico em vários aspectos da neurotransmissão do glutamato.

Devido à ausência de enzimas degradativas na sinapse, a captura pelos EAATs dos astrócitos é o principal mecanismo através do qual a ação do glutamato extracelular é encerrada. Assim, uma disfunção nesse sistema resulta em várias formas de dano celular e parece estar relacionada aos transtornos neuropsiquiátricos, como o TDM (PITT et al., 2003).

A suplementação oral de acetilcisteína pode normalizar alterações em níveis de glutamato no cérebro causados por deficiências no ciclo glutamina-glutamato (MCQUEEN et al., 2018). Isso pode ser de relevância terapêutica, visto que anormalidades neste ciclo

estão relacionadas aos sintomas de TDM (MORIGUCHI et al., 2019). A redução dos níveis de glutamato parece ser obtida por meio da suprarregulação do trocador cistina-glutamato e da função melhorada dos transportadores astrocíticos de glutamato (LEWERENZ et al., 2013).

Czéh et al. (2006) demonstraram que animais expostos ao estresse crônico tiveram além de aumento da excitotoxicidade por glutamato (SAPOLSHY, 2013), diminuição da densidade astrocítica no hipocampo. Já se sabe que o GFAP desempenha um papel fundamental no tráfego de transportadores de glutamato e na proteção do cérebro contra a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (SULLIVAN et al., 2007).

Estudos *post-mortem* dos tecidos de pacientes com TDM mostraram um número reduzido e uma morfologia alterada de células gliais em várias regiões cerebrais (RAJKOWSKA et al., 2005). Choudary et al. (2005) também verificaram redução na expressão de mRNA para EAAT1, EAAT2 e glutamina sintetase em amostras cerebrais *post mortem* de indivíduos com TDM. Por outro lado, alguns estudos relacionam a depressão à alta expressão de GFAP (CHEN et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2016; HO; SOMMERS; LUCKI, 2013), o qual pode refletir uma reação compensatória ao dano neuronal, especialmente a longo prazo (RAJKOWSKA et al., 2005).

A exposição ao estresse pode ser relacionada a algumas das patologias de células gliais. Um estudo usando o modelo de depressão por ECI em ratos mostrou que a redução induzida por estresse na expressão de GFAP no hipocampo foi revertida por tratamento com o antidepressivo tricíclico clomipramina (LIU et al., 2009). Willard et al. (2013) observaram uma diminuição no número total de células gliais no hipocampo anterior, em um modelo de depressão em primata não humano.

1.5 Modelo de depressão induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível

O estresse crônico é um fator de risco para o desenvolvimento de várias psicopatologias, pois causa a perturbação do funcionamento fisiológico e psicológico de um indivíduo e, assim, afeta seu comportamento nos papéis afetivo, social e cognitivo (VAN BOXELAERE et al., 2017). O estresse é um dos principais contribuintes para as doenças neuropsiquiátricas, como a depressão, a ansiedade, o transtorno pós-traumático e disfunções de memória e aprendizagem (MEHTA; PARASHAR; UDAYABANU, 2017; NORMANDEAU et al., 2018).

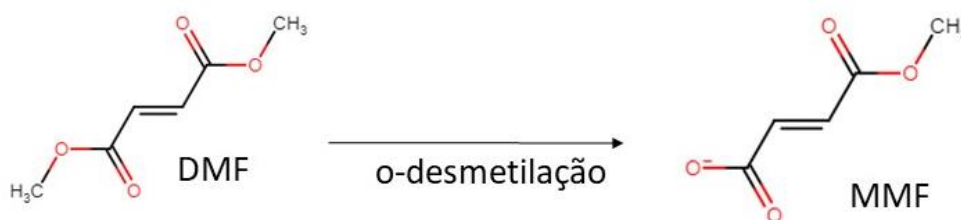
Diferentes modelos animais foram estabelecidos para investigar os distúrbios neuropsiquiátricos, como a depressão, induzida pelo estresse. Dessa forma, um modelo para verificar o comportamento dos animais submetidos a diversos estressores físicos foi proposto, com a finalidade de mimetizar uma situação semelhante à que ocorre no ser humano. Observou-se que o período de estresse prolongado gera a redução do consumo de líquidos doces, o que caracteriza a anedonia, ou seja, a perda da capacidade de prazer ou de responder a eventos agradáveis, que é um dos sintomas característicos da depressão em humanos (WILLNER, 2016).

Este modelo consiste em submeter os animais a vários fatores estressantes, de forma aleatória e imprevisível, durante semanas, a fim de induzir o comportamento depressivo-símile e observar as alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem no cérebro (WILLNER, 2017). Já foi demonstrado em diversos estudos, que a aplicação deste modelo pode gerar alteração no tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (DING et al., 2014), redução da preferência pelo consumo de sacarose (HE et al., 2016), aumento na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (FARIA et al., 2014), diminuição do peso corporal (GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2014), aumento da peroxidação lipídica (RINWA; KUMAR, 2012), de nitrito e de corticosterona sérica (XU et al., 2017). Desta forma, foi utilizado este modelo para investigar o efeito do dimetil fumarato na depressão.

1.6 Dimetil fumarato e a via Nrf2

O dimetil fumarato (DMF) é um ativador da via do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que demonstrou efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (LOEWE et al., 2002), sendo usado para o tratamento de psoríase (OCKENFELS et al., 1998) e foi aprovado em 2013 para o tratamento de esclerose múltipla, uma doença inflamatória auto-imune do SNC caracterizada por desmielinização e perda axonal (AL-JADERI; MAGHAZACHI, 2016; XU et al., 2015). Após administração oral, o DMF é rapidamente metabolizado a monometil fumarato (MMF), que atravessa a barreira hematoencefálica e atinge níveis detectáveis no SNC (KAUPPINEN et al., 2013; LINKER; GOLD, 2013) (FIGURA 1).

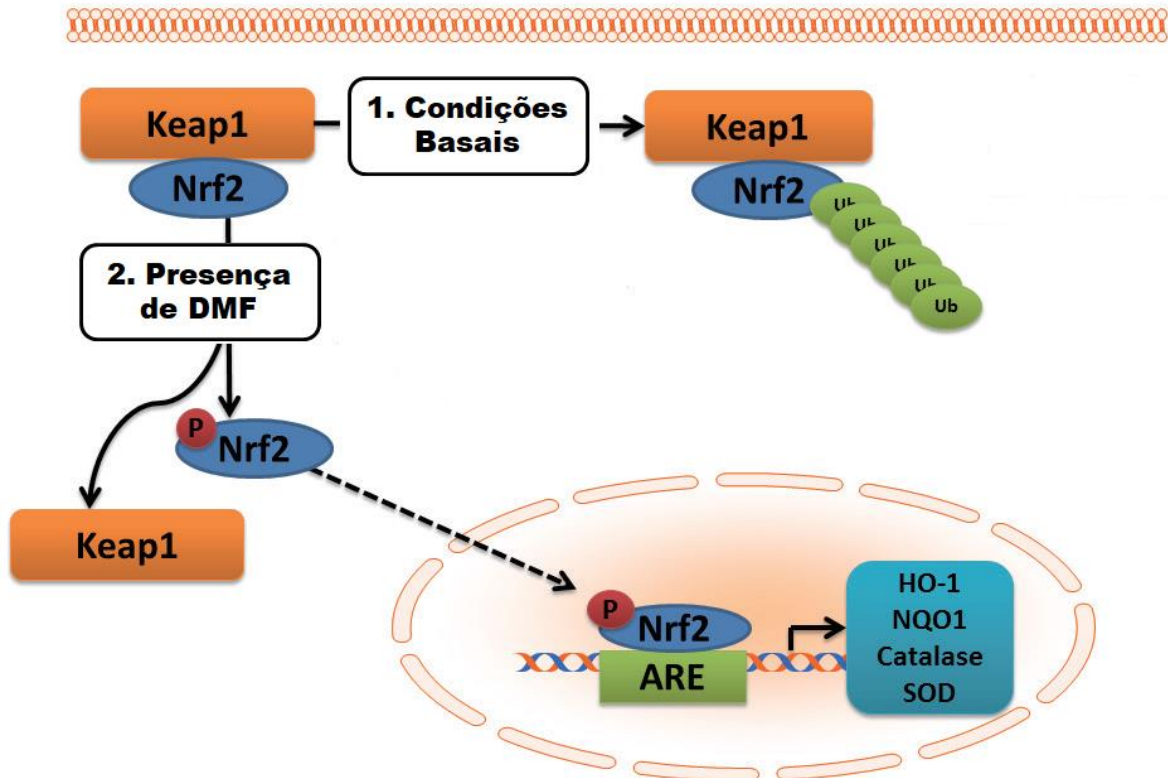
Figura 1 - Estruturas químicas do dimetil fumarato (DMF) e do seu metabólito monometil fumarato (MMF)



Fonte: Adaptado de <https://www.chemeo.com/cid/55-163-0>.

Nrf2 é um fator de transcrição nuclear, que, sob condições basais, forma um complexo com a proteína Kelch 1 associada a ECH (Keap1), o qual leva à ubiquitinação e degradação de Nrf2 pelo sistema ubiquitina-proteassoma (MCMAHON et al., 2006; SILVA-ISLAS; MALDONADO, 2018). Já quando ativado, pelos fumaratos, por exemplo, o Nrf2 transloca-se para o compartimento nuclear e liga-se a elementos de resposta antioxidante (ARE) nas regiões promotoras dos genes de enzimas de fase 2, regulando, assim, a expressão de enzimas como a glutationa S-transferase (GST), glutationa reduzida (HARVEY et al., 2009), tioredoxina (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007), a heme oxigenase 1 (HO-1), a NADPH quinina oxidoreductase 1 (NQO-1) (CALKINS et al., 2009; DINKOVA-KOSTOVA; ABRAMOV, 2015), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CHEN; ZHANG; CAI, 2014) que desempenham papéis importantes no tratamento antioxidante (STEFANSON; BAKOVIC, 2014; ZHANG et al., 2013) (FIGURA 2).

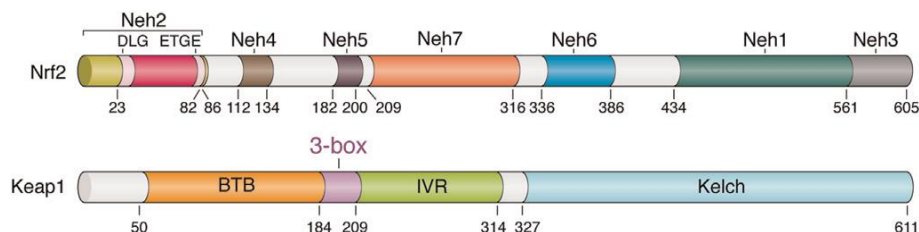
Figura 2 – Mecanismo de ação do Nrf2



Fonte: Adaptado de Chen; Zhang; Cai (2014)

Keap1 é um membro redox da família *Broad-complex, Tramtrack, and Bric-à-brac* (BTB)- Kelch (BTB-Kelch), que se reúne com a proteína Cullin3 (Cul3) para formar um complexo Cullin-RING E3 ligase para a degradação de Nrf2. Keap1 compreende três domínios abrangendo cerca de 611 aminoácidos (CANNING; SORRELL; BULLOCK, 2015). O domínio BTB N-terminal foi nomeado em referência à proteína de *Drosophila* Broad complex, Tramtrack e Bric à brac, em que foi identificado pela primeira vez. O domínio BTB medeia a homodimerização de Keap1 e contribui adicionalmente para sua interação com Cul3 (CLEASBY et al., 2014). Uma outra interação a Cul3 é fornecida pela parte proximal da região intermediária, do inglês *intervening region* (IVR). O domínio Kelch C-terminal é necessário para a ligação de substratos e pode se ligar separadamente aos motivos ETGE ou DLG de Nrf2. A proteína Nrf2 em humanos tem 605 aminoácidos de comprimento e contém sete regiões altamente conservadas conhecidas como domínios de homologia Nrf2-ECH (Neh) (CANNING; SORRELL; BULLOCK, 2015) (FIGURA 3).

Figura 3 - Arquitetura de domínio das proteínas Keap1 e Nrf2



Fonte: Canning et al. (2015).

Vários estudos têm demonstrado que fumaratos atuam como eletrófilos reativos, "aceptores de Michael" que se ligam covalentemente a grupos tióis nucleofílicos em macromoléculas. Foi demonstrado, por espectrometria de massas, que o MMF, por exemplo, liga-se covalentemente ao resíduo cisteína 151 do domínio BTB da Keap1 (LINKER et al., 2011; SCHULZE-TOPPHOFF et al., 2016).

O Nrf2, através do seu domínio Neh2, liga-se a uma grande cavidade central com carga positiva do domínio Kelch da Keap1. Marcotte et al. (2013), determinaram, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa nativa e cristalografia de raios-X, que esse local de interação, caracterizado pela presença dos resíduos de arginina 380, 415 e 483 (DAVIES et al., 2016; TONG et al., 2006), poderia ser bloqueado por uma molécula pequena inibidora, como os dimetil e monometil fumaratos. .

A sinalização inadequada de Nrf2 diante do estresse oxidativo crônico tem sido proposta como mecanismo patológico na regulação de doenças inflamatórias da via, podendo ser benéfico em uma variedade de áreas terapêuticas, incluindo condições cardiovasculares, respiratórias e neurodegenerativas (BOUTTEN et al., 2011). Foi demonstrado que o Nrf2 desempenha um papel importante nas doenças do SNC. A ativação do Nrf2 protege os neurônios contra acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico, lesão cerebral traumática e distúrbios neurodegenerativos em animais (IADECOLA; ANRATHER, 2011; MAGESH; CHEN; HU, 2012).

Foi relatado que o DMF melhora a sobrevivência de astrócitos e neurônios submetidos ao estresse oxidativo *in vitro* (ALBRECHT et al., 2012; LINKER et al., 2011) e atenua o estresse oxidativo e inflamação induzidos por 6-hidroxidopamina no estriado de camundongos (JING et al., 2015). Além disso, Campolo et al. (2017) relataram que o DMF reduziu significativamente a degeneração das células neuronais do trato dopaminérgico e os comprometimentos comportamentais em camundongos submetidos ao modelo de *Parkinson* induzido por MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), via regulação da via NF-

κ B / Nrf2. Pelo mesmo modelo, Chen et al. (2009) demonstraram que astrócitos com ativação de Nrf2, mas não neurônios, podem reduzir a neurotoxicidade induzida por MPTP, indicando que o Nrf2 astrocítico é crítico para a neuroproteção.

O pré-tratamento com DMF também atenuou o dano neuronal e a apoptose no modelo de abrasamento por PTZ; induziu expressão aumentada de Nrf2; aumentou a expressão de NQO1 e HO-1 e regulou negativamente a expressão de genes apoptóticos e pró-inflamatórios no hipocampo de ratos (SINGH et al., 2019).

Por fim, o DMF exerceu efeitos comportamentais promissores do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao ECI, suprimindo a expressão de NF- κ B, TNF- α e IL-1 β , reduzindo o estresse oxidativo e regulando positivamente os níveis BDNF hipocampal (ABD EL-FATTAH et al., 2018), serotonina sérica e GSH (KORTAM; ALI; FATHY, 2021). Além disso, um tratamento de dois anos com DMF foi associado à desaceleração do comprometimento cognitivo e a melhorias significativas na função psicossocial de pacientes com esclerose múltipla (AMATO et al., 2020).

No entanto, camundongos deficientes em Nrf2 também apresentaram resultados benéficos após tratamento com DMF, o que foi associado com redução de células Th1 e Th17 e indução aumentada de monócitos M2 anti-inflamatórios (SCHULZE-TOPPHOFF et al., 2016). Essas observações sugeriram que respostas imunomoduladoras e antiinflamatórias iniciadas pelo DMF podem ocorrer por vias alternativas, independentemente do Nrf2.

Assim, iniciaram-se estudos neste campo, que demonstraram que o fumarato de monometila, metabólito do DMF, teve efeito agonista no receptor de ácido hidroxicarboxílico 2 HCAR2 (TANG et al., 2008). O HCAR2 é um receptor de membrana acoplado a proteína Gi conhecido pela supressão da ativação pró-inflamatória e recrutamento quimiotático de células imunes, como células dendríticas e macrófagos (REZQ; ABDEL-RAHMAN, 2016).

HCAR2 é expresso no cérebro de mamíferos, por exemplo em neurônios hipotalâmicos de roedores (FU et al., 2015). Evidências sugerem que HCAR2 pode mediar efeitos anti-neuroinflamatórios (OFFERMANN; SCHWANINGER, 2015).

Dessa forma, o presente estudo se propõe a investigar a interação que ocorre entre o dimetil fumarato e a proteína Keap1/Nrf2, bem investigar outros prováveis alvos proteicos deste fármaco. Como a depressão e outras doenças neuropsiquiátricas têm um fenótipo pró-inflamatório (HAAPAKOSKI et al., 2016) e doenças inflamatórias são frequentemente associadas a sintomas depressivos (MILLER; RAISON, 2016), postula-se que o DMF tenha efeito antidepressivo e objetiva-se investigar os mecanismos moleculares antiinflamatórios envolvidos neste efeito.

2 JUSTIFICATIVA

Os antidepressivos disponíveis atualmente levam semanas para alcançar seus efeitos completos, deixando os pacientes vulneráveis a sintomas devastadores e aumentando o risco de suicídio. Além disso, cerca de 33% dos pacientes não são responsivos ao tratamento existente ou apresentam efeitos colaterais. Assim, o estudo de novos alvos terapêuticos, bem como de coadjuvantes no tratamento da depressão, tem sido grandemente estimulado, visto que podem gerar um substancial impacto benéfico na qualidade de vida dos pacientes, bem como na saúde pública.

Diversos estudos mostram o envolvimento da inflamação e do estresse oxidativo na fisiopatologia do TDM e que estes podem estar relacionados à resposta ao tratamento para depressão (MAES et al., 2011; NG et al., 2008; UHER et al., 2014). O Estresse Crônico Imprevisível, por sua vez, é um modelo validado de depressão, que ocorre através da indução de neuroinflamação. Assim, o estudo do dimetil fumarato, um fármaco com ação antioxidante e anti-inflamatória, usando o modelo de ECI, mostra-se muito promissor.

Além disso, já existem consideráveis evidências dos efeitos benéficos do dimetil fumarato em patologias do SNC, entretanto há poucos estudos sobre a interação deste com seus alvos e, até o presente momento, não há estudos que tenham realizado o *docking* com seu alvo mais provável, a proteína HCAR2, buscando uma análise das alterações cerebrais relacionadas à cascata de sinalização envolvida, sendo este trabalho inédito na literatura. Dessa forma, o presente estudo é dotado de relevância visto que busca uma melhor compreensão do mecanismo molecular de um fármaco promissor para o tratamento do TDM e, assim, um possível reposicionamento do DMF.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito antidepressivo do dimetil fumarato em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível, através do envolvimento de mecanismos astrocíticos e microgliais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do dimetil fumarato sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiogênico e depressivo símile, provocados pelo Estresse Crônico Imprevisível, em camundongos;
- Determinar o efeito do dimetil fumarato sobre a performance cognitiva de camundongos submetidos ao Estresse Crônico Imprevisível;
- Investigar o efeito do dimetil fumarato sobre a expressão de marcadores de astrócitos (GFAP) e de micróglia (Iba1), através de testes de imunofluorescência, em hipocampo de camundongos submetidos ao Estresse Crônico Imprevisível;
- Determinar o efeito do dimetil fumarato sobre a expressão das citocinas pró- inflamatórias TNF- α e IL-1 β , por ensaio imunoenzimático, em hipocampo de camundongos submetidos ao Estresse Crônico Imprevisível.
- Realizar a predição dos alvos biológicos do MMF (metabólito ativo do DMF), modelagem molecular e cálculos de *docking* molecular com as proteínas Keap1 e HCAR2.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss*, machos, adultos, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixas de propileno $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob número 104/17.

4.2 Drogas

As substâncias descritas a seguir foram administradas no volume de 0,1 mL/10 g de peso do animal.

- Dimetil fumarato (Sigma-Aldrich®): Foram utilizadas as doses de 50 e 100 mg/kg (vo); meio de dissolução: carboximetilcelulose 0,5% (ABD EL-FATTAH et al., 2018).
- Fluoxetina (Lilly®): Foi utilizada a dose de 10 mg/kg (vo) (ZHENG et al., 2012); meio de dissolução: água destilada.

4.3 Protocolo de Estresse Crônico Imprevisível

O protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) foi conduzido como previamente descrito na literatura (GARZA et al., 2012; LU et al., 2006; WILLNER et al., 1987). Para tanto, os animais submetidos ao ECI foram expostos a eventos estressores durante 28 dias, randomicamente organizados, de modo que cada evento foi aplicado uma vez a cada semana, de forma aleatória. Os eventos estressores foram aplicados diariamente, um por dia, em diferentes horários, a fim de minimizar sua predictibilidade. Todos os eventos estressores foram aplicados em uma sala de procedimentos separada, na qual os animais ainda permaneceram por cerca de 1-2h após o procedimento, para permitir que o odor proveniente do estresse fosse dissipado. Os eventos estressores utilizados foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo do Estresse Crônico Imprevisível

Evento Estressor	Tempo
Estresse de contenção	2h
Inclinação de caixa	8 h
Ciclo intermitente entre luzes acesas e apagadas	18h
Luz constante	24h
Privação de água	24h
Maravalha molhada	24h
Choque elétrico (1 mA)	2s

Fonte: Adaptado de Garza et al. (2012).

4.4 Delineamento experimental

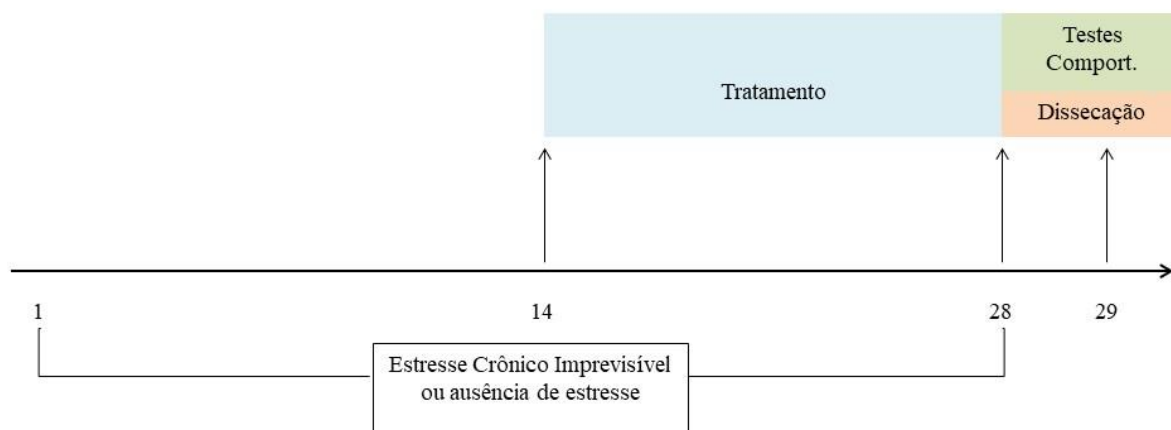
Os camundongos foram primeiramente divididos em dois grupos, controle (que não passaram pelo protocolo de estresse – grupos 1 a 4) e ECI (que foram submetidos aos eventos estressores - grupos 5 a 8), os quais foram subdivididos nos grupos: veículo (carboximetilcelulose 0,5%), DMF50, DMF100 e FLU (n=10 animais por grupo):

- **Grupo 1: CONT+VEI:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressante durante 4 semanas e administração de carboximetilcelulose 0,5% por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.
- **Grupo 2: CONT+DMF50:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressante durante 4 semanas e administração de dimetil fumarato 50mg/kg por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.
- **Grupo 3: CONT+DMF100:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressante durante 4 semanas e administração de dimetil fumarato 100mg/kg por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.
- **Grupo 4: CONT+FLU:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressante durante 4 semanas e administração de fluoxetina 10mg/kg por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.
- **Grupo 5: ECI+VEI:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de carboximetilcelulose 0,5% por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.
- **Grupo 6: ECI+DMF50:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de dimetil fumarato 50mg/kg por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.

- **Grupo 7: ECI+DMF100:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de dimetil fumarato 100mg/kg por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.
- **Grupo 8: ECI+FLU:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de fluoxetina 10mg/kg por via oral (v.o.) do 15° ao 28° dia.

Quatorze dias após o início do protocolo, tempo necessário para o animal desenvolver comportamentos depressão-símile (HE et al., 2016; LU et al., 2006), iniciaram-se os tratamentos em todos os grupos, uma vez ao dia. Os grupos ECI receberam os fármacos 30 minutos antes da aplicação diária do estresse. No mesmo momento do dia, os animais controle receberam iguais tratamentos (veículo, dimetil fumarato 50mg/kg, dimetil fumarato 100mg/kg ou fluoxetina 10mg/kg). Além disso, o peso corporal dos animais foi monitorado. No 29° dia, todos os animais foram submetidos a testes comportamentais, conforme descrito abaixo. O delineamento do experimento está representado na Figura 4.

Figura 4 - Delineamento experimental



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Testes *in vivo*

4.5.1 *Teste do Campo Aberto*

Com a finalidade de analisar a atividade locomotora, os animais foram avaliados no teste do campo aberto. A arena para o teste é feita de acrílico (30 x 30 x 15 cm) com o chão dividido em nove quadrados iguais. A atividade exploratória do animal foi registrada durante 5

minutos (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: o número de quadrados atravessados pelo animal, número de *groomings* (comportamento estereotipado de autolimpeza) e *rearings* (atividade exploratória vertical). Os experimentos foram realizados em uma sala de som atenuado, sob baixa intensidade de luz vermelha.

4.5.2 Teste do Nado Forçado

Os animais foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico (altura- 35 cm; diâmetro- 24 cm), contendo 13,5 cm de água mantida a 22-24 ° C. Após 1 minuto de habituação, o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais foi avaliado durante 5 minutos, em um tempo total de 6 minutos no interior do cilindro. Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

4.5.3 Teste de preferência pela sacarose (PPS)

Para a avaliação da PPS, inicialmente as garrafas de água pura e solução de sacarose 1% (peso inicial) foram pesadas. Após esse procedimento foram oferecidas as duas garrafas para os ratos por um período de 24 horas e depois disto foram pesadas novamente as garrafas (peso final). O consumo, tanto de água como de sacarose foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final (WILLNER et al., 1987). A preferência foi calculada em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e o consumo total de água (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de água) + consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e multiplicando-o por 100.

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

4.5.4 Labirinto em Y

Este teste avalia a memória a curto prazo, também denominada de memória espacial de trabalho. O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento. Neste teste, o animal foi colocado em um dos braços e foi realizada a contagem de alternâncias corretas, ao entrar nos braços, durante 8 (oito) minutos (LALONDE, 2002).

Este teste baseia-se na tendência dos roedores de alternância espontânea. O intuito

do teste é verificar se o animal, ao entrar em um dos braços, é capaz de relembrar-se do braço previamente explorado, dando preferência a explorar um braço diferente do anterior. Os dados foram expressos como a razão entre as alternâncias corretas e o número de visitas realizadas durante o período de observação, sendo o resultado multiplicado por 100.

4.5.5 Reconhecimento do objeto novo (NOR)

O NOR foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos das drogas sobre a capacidade de memorizar e reconhecer objetos, novos e já conhecidos. Este teste avalia a memória cognitiva de objetos e consiste em três etapas: habituação, familiarização e fase teste, executadas de acordo com Ennaceur e Delacour (1988), que serão discriminadas a seguir.

Cada animal foi, primeiramente, habituado em uma arena de campo aberto vazia (aparato em acrílico com paredes transparentes e fundo preto, de dimensões 30x30x15), por 5 minutos. Após 15 minutos, os animais foram submetidos à fase de familiarização, na qual foram expostos exatamente no meio da caixa, paralelos, e a 10 cm das paredes laterais a dois objetos iguais A1 e A2, denominados de objetos familiares, por 5 minutos. Nesse contexto, Ennaceur e Delacour (1988) definiram como exploração o direcionamento do focinho para o objeto a uma distância de 2 cm ou menos dele, como também tocá-lo com o focinho ou cheirá-lo. Após um período de 2 minutos, eles retornaram para a arena, na qual havia dois objetos, um idêntico ao familiar (mas não previamente usado) e outro novo. Assim, foi permitido aos animais explorarem o ambiente por 5 minutos, nos quais a quantidade de tempo explorando cada objeto foi registrada. Os objetos familiar e novo foram alternados de posição para cada animal testado, e foi feita assepsia dos objetos e da arena com álcool 10% entre os ensaios.

Para a análise dos resultados foi utilizado o índice de discriminação: $(\text{tempo explorando o objeto novo} - \text{tempo explorando o objeto familiar}) / (\text{tempo explorando o objeto novo} + \text{tempo explorando o objeto familiar})$.

4.6 Testes *ex vivo*

Após o último dia de observação comportamental, os animais foram sacrificados por decaptação, e, rapidamente, seus cérebros foram dissecados.

4.6.1 *Imunofluorescência*

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina 90 mg/kg e xilazina 9 mg/kg, IP, e perfundidos transcardiacamente com 0,1 M de tampão de fosfato salino (PBS, pH 7,2), seguido por paraformaldeído a 4% em PBS, durante a fixação do tecido. Os cérebros foram removidos e pós-fixados em 4% de paraformaldeído por 24 h e crioprotetidos por incubação em 30% sucrose/0,1 M de tampão fosfato. Uma vez retirados desta solução, os cérebros foram embebidos em Tissue-Tek (Sakura-Américas, EUA), congeladas a - 80°C e cortados em 50 seções coronais, utilizando um Criostato CM1850 para cortes em congelamento e acessórios da marca Leica Mikrosysteme. Fatias de todo o hipocampo foram recolhidas em série e armazenadas em placas de imunohistoquímica de 24 poços, na forma de seções flutuantes imersas em PBS com 0,01% de NaN₃ (azida de sódio, em pó a partir de Sigma-Aldrich™, EUA), sendo posteriormente lavadas novamente em PBS, fixadas e montadas nas lâminas.

Os cortes de hipocampo foram submetidos a um processo de recuperação de antígeno e foram incubados durante a noite a 4 ° C com o anticorpo monoclonal Iba1 (E4O4W) XP® anti-coelho, conjugado com *Alexa Fluor*® 555 (1: 300, Cell Signaling Technology), para marcar microglia, ou com GFAP (policlonal de cabra 1: 200, Santa Cruz Biotechnology) e posteriormente, foram incubados no anticorpo secundário *Alexa Fluor 488* IgG anti-cabra de burro (1: 200, Invitrogen), para marcar astrócitos. Por fim, os cortes foram corados com 1 µg / mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e cobertas com uma lamínula usando *Prolong Gold Antifade Mountant* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As lâminas foram fotografadas usando um leitor de slides Cytation 3 (Carl Zeiss, White Plains, NY, EUA) por meio de uma ampliação de 20 lentes objetivas, com exposição, ganho e deslocamento constantes. Os subcampos do hipocampo CA1, CA3 e DG foram identificados de acordo com Paxinos e Franklin (2001) e quatro a cinco fotomicrografias de cada área para cada grupo foram analisadas. O experimentador que tirou as imagens estava cego para os tratamentos. A análise da intensidade de fluorescência foi semiquantitativa, usando o pacote de software ImageJ.

4.6.2 *Ensaio imunoenzimático*

Para este teste, o hipocampo foi homogeneizado em 8 volumes de solução salina tamponada com fosfato (PBS) com inibidores de protease (EMD Biosciences) e fosfatase

(Sigma-Aldrich) e centrifugado (12.000 r.p.m, 5 min). A concentração de TNF- α e IL-1 β nas amostras de 50 μ l foi determinada por ensaio imunoenzimático ELISA (R&D Systems, Mineápolis, MN, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e expressa em pg / g de tecido.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com GraphPad Prism for Windows (versão 8.0, San Diego, EUA). Os dados dos testes comportamentais e neuroquímicos foram expressos como médias \pm E.P.M. Para os dados comportamentais, as análises foram realizadas por two-way ANOVA (análise de variância), usando como fatores “modelo ECI” (grupos ECI ou grupos controle) e "tratamento" (DMF50, DMF100, FLU), seguido pelo teste de Tukey. Para dados neuroquímicos, as análises foram realizadas por one-way ANOVA, seguido também pelo teste de Tukey. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

4.8 Testes *in silico*

4.8.1 *Predição de Alvo*

A predição dos alvos biológicos do MMF foi realizada por meio dos servidores Swiss Target Prediction (GFELLER; MICHIELIN; ZOETE, 2013) e Similarity Ensemble Approach (SEA) (KEISER et al.2007). Estes servidores estimam os alvos macromoleculares mais prováveis de uma pequena molécula, considerada bioativa. A predição é baseada em uma combinação de similaridade desta com uma biblioteca de ativos conhecidos.

4.8.2 *Modelagem baseada em alvo*

A sequência primária do receptor de ácido hidroxicarboxílico 2 (HCAR2) foi obtida no servidor Uniprot (BATEMAN et al., 2021) e submetida, no formato FASTA, ao servidor I-TASSER (YANG; ZHANG, 2015), no qual a estrutura 3D do HCAR2 foi construída por modelagem baseada em alvo, utilizando um método de threading (enovelamento de proteínas). O modelo gerado pelo servidor prosseguiu para a etapa de refinamento, no servidor GalaxyRefine (HEO et al., 2014). O servidor MolProbity foi utilizado para analisar a qualidade das estatísticas da proteína modelada (WILLIAMS et al.,

2018).

4.8.3 Cálculos de Docking Molecular

Cálculos de *docking* molecular foram realizados utilizando os programas Glide e CovDock, considerando o ligante flexível e a proteína rígida. A estrutura do monometil fumarato foi obtida no servidor Pubchem (PUBCHEM ID 5369209). As estruturas 3D da proteína Keap1 foram obtidas pelo *Protein Data Bank* (BERMAN et al., 2000), PDB ID 6HWS para o domínio Kelch e 5GIT para o domínio BTB. Como a estrutura 3D do HCAR2 não está disponível no PDB, ela foi construída por modelagem baseada em alvo, conforme previamente descrito.

Os cálculos de *docking* molecular do ligante MMF nas proteínas HCAR2 e Keap1 (domínio Kelch) foram realizados utilizando o software Maestro Glide no modo de precisão extra (XP) (FRIESNER et al., 2006). Cálculos de *docking* covalente foram realizados para o domínio BTB da proteína Keap1, usando o programa Maestro CovDock (ZHU et al., 2014). As estruturas das proteínas foram preparadas utilizando a ferramenta Protein Preparation Wizard, adicionando os átomos de hidrogênio e minimizando a energia, utilizando o campo de força OPLS-2005. Os ligantes foram preparados por meio da ferramenta LigPrep, corrigindo a protonação, segundo o Epik, e realizando a minimização da energia. As coordenadas do *grid* de proteína para HCAR2 foram centradas nos resíduos Arg111, Arg251 e Thr284, fornecidos pelo servidor I-TASSER como sítio de ligação previsto do ligante à proteína homóloga Nociceptina /orfanina FQ (PDB ID 4EA3A) (YANG; ZHANG, 2015) e que corroboram com o sítio de ligação encontrado por Offermanns e colaboradores (2011). Para o domínio Keap1 Kelch, as coordenadas do *grid* de proteína foram centralizadas nos resíduos Arg380, Ser363, Arg415, Gln530, Ser555 e Tyr572 (UNNI et al., 2021) e para o domínio BTB da Keap1 foram: Cys 151, Lys 131 (LINKER; GOLD, 2013), conforme descrito na literatura. O servidor PLIP (SALENTIN et al., 2015) foi utilizado para identificar interações não covalentes entre proteínas e ligantes. O programa Pymol foi usado para a inspeção visual de poses de encaixe 3D e para fornecer as imagens moleculares 3D (DELANO, 2002).

5 RESULTADOS

5.1 Testes *in vivo*

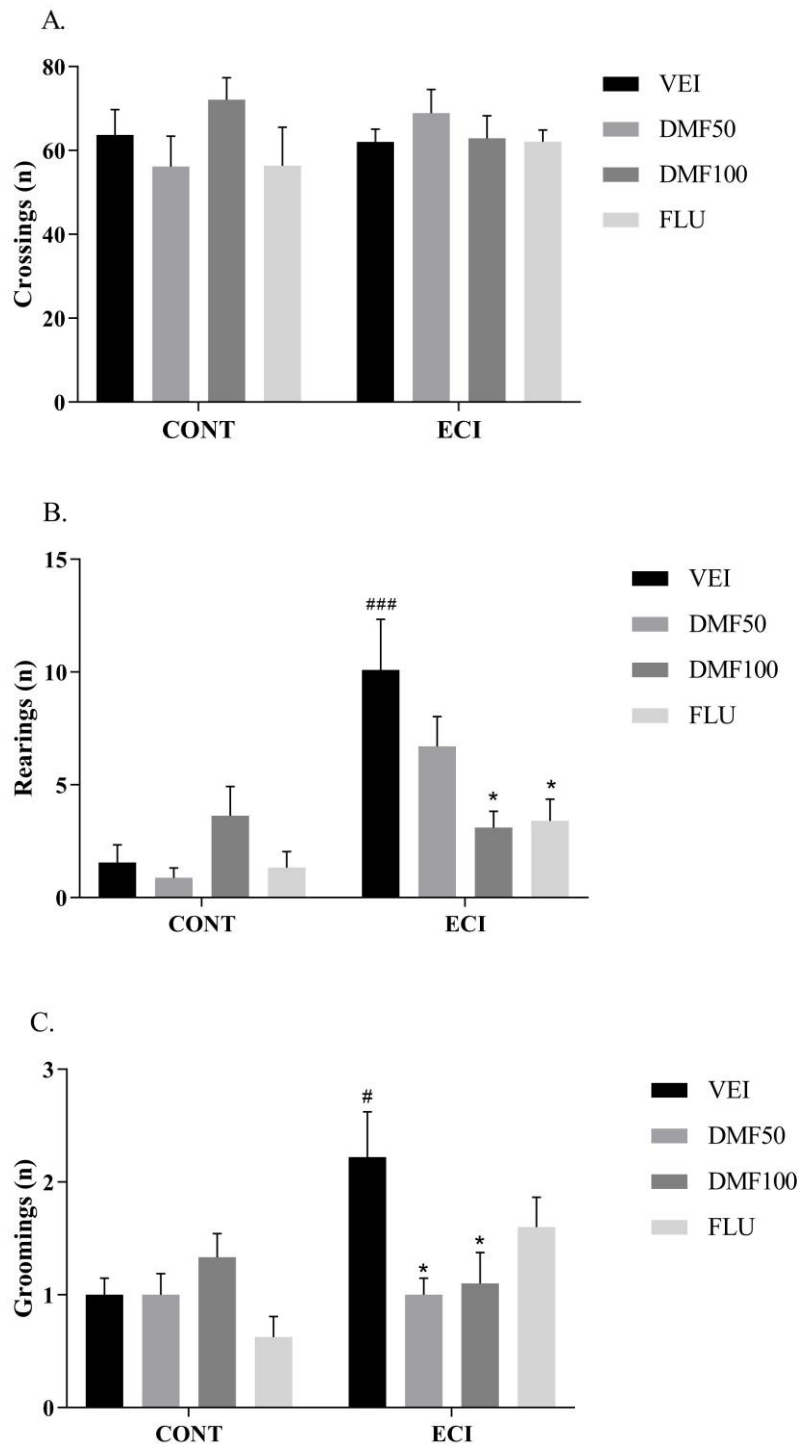
5.1.1 *Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI.*

Não houve diferenças significativas no número de cruzamentos entre os grupos estudados, mostrando que o modelo ECI e o tratamento com DMF e FLU não alteraram a atividade locomotora dos animais (FIGURA 5A).

A análise do número de *rearings* no teste de campo aberto por two-way ANOVA revelou uma interação significativa entre os fatores “modelo ECI” e “tratamento” [F (3, 63) = 5,012, P = 0,0035]. A este respeito, observou-se um aumento significativo no número de *rearings* no grupo ECI+VEI em relação ao controle (CONT+VEI) (p <0,001). Além disso, os grupos ECI + FLU e ECI + DMF100 apresentaram redução significativa desse parâmetro quando comparados ao grupo ECI+VEI (p <0,01) (FIGURA 5B).

Na avaliação do número de *groomings*, também se observou uma interação significativa entre os fatores [F (3, 64) = 5,667, p = 0,0017]. O grupo ECI+VEI apresentou aumento neste parâmetro em relação ao controle (de cerca de 120%, p<0,05). O tratamento com DMF em ambas as doses reverteu este aumento (p<0,05) (FIGURA 5C). A redução de *groomings* provocada pelo tratamento com DMF foi de cerca de 55%, enquanto que pelo tratamento com a FLU foi aproximadamente 27%, mostrando um resultado superior do DMF.

Figura 5 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI.

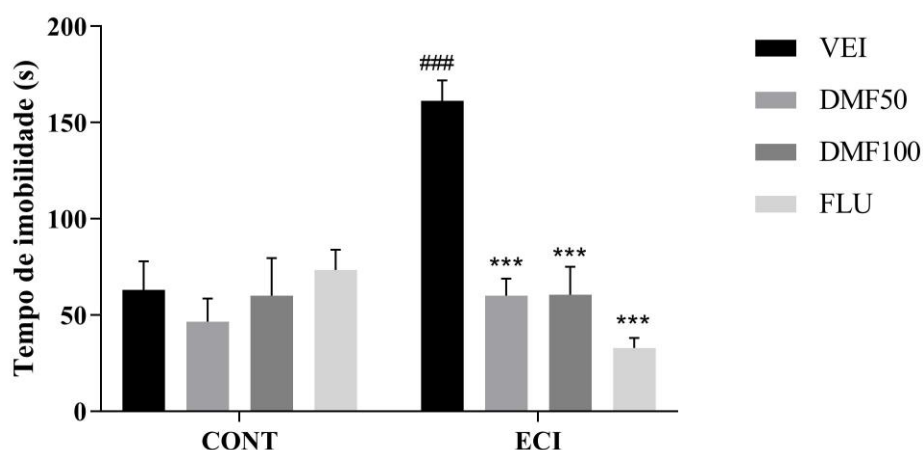


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: #p <0,05, ###p<0,001 vs controle (CONT+VEI), *p<0,05 vs ECI+VEI. Abreviações: VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.1.2 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao ECI.

A análise do tempo de imobilidade por two-way ANOVA demonstrou uma interação significativa [$F(3, 66) = 11,30, P < 0,0001$] entre os fatores “modelo ECI” e “tratamento”. O ECI aumentou o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). O tratamento com DMF 50, DMF100 e FLU por sua vez, reverteu este resultado ($p < 0,001$), apresentando uma redução de cerca de 62% nos grupos tratados com DMF em ambas as doses, e de 79% no grupo FLU, como mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao ECI.



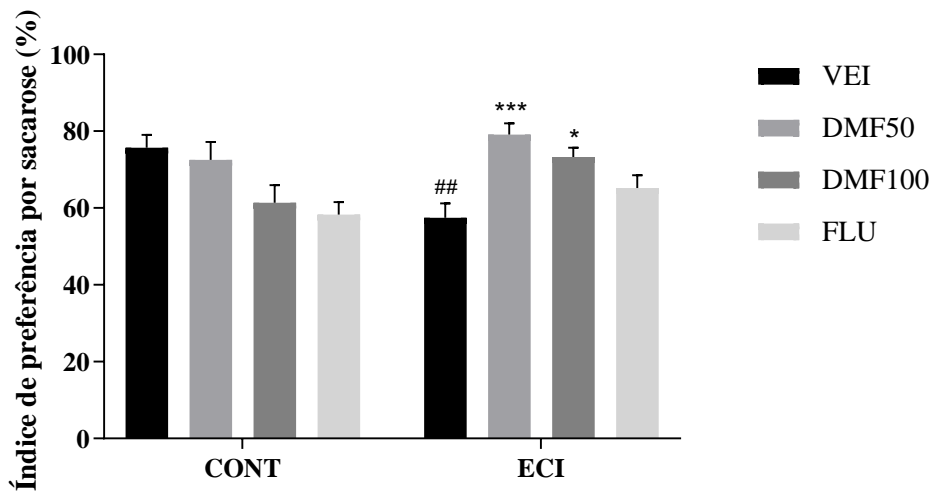
Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste deTukey. Valores significativos: $###p < 0,001$ vs controle (CONT+VEI), $***p < 0,001$ vs ECI+VEI. Abreviações: VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.1.3 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a preferência pela sacarose em camundongos submetidos ao ECI.

Além do tempo de imobilidade, o ECI modificou outro parâmetro indicativo de comportamento depressivo-símile, o índice de preferência pela sacarose, o qual foi diminuído significativamente comparando-se ao controle ($p < 0,01$), indicando comportamento anedônico. Os grupos ECI+DMF50 e ECI+DMF100 levaram ao aumento deste índice em relação ao grupo ECI+VEI ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, que em termos percentuais foi de 37% e 27%,

respectivamente), como mostrado na Figura 7. A interação entre os fatores foi significativa $F(3, 64) = 7,628, p=0,0002$.

Figura 7 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre a preferência pela sacarose em camundongos submetidos ao ECI.

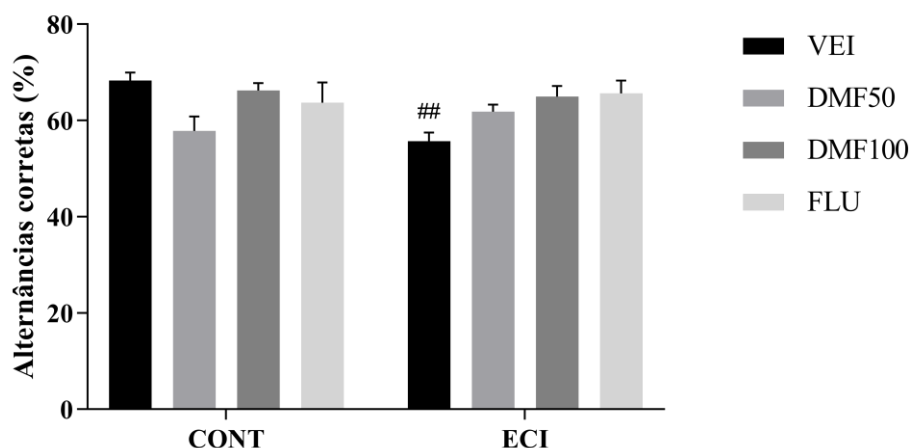


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste deTukey. Valores significativos: $\#\#p<0,01$ vs controle (CONT+VEI), $*p<0,05$, $***p<0,001$ vs ECI+VEI. Abreviações: VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.1.4 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y em camundongos submetidos ao ECI.

A análise da memória espacial de curta duração por two-way ANOVA demonstrou uma interação significativa [$F(3, 59) = 4,858, p=0,0044$] entre os fatores “modelo ECI” e “tratamento”. Na Figura 8, pode-se observar que o ECI levou à redução na porcentagem de alternâncias corretas em relação ao controle ($p<0,05$). No entanto, os grupos tratados com DMF e FLU não reverteram esta diminuição.

Figura 8 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre as alternâncias corretas no labirinto em Y, em camundongos submetidos ao ECI.

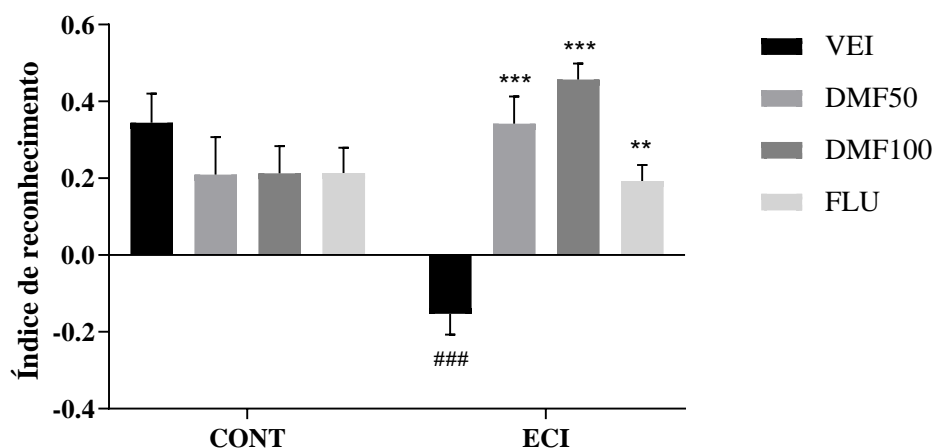


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste deTukey. Valores significativos: ##p<0,01 vs controle (CONT+VEI). Abreviações: VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.1.5 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI.

Com relação à memória cognitiva de objetos ou episódica (FIGURA 9), observou-se que o ECI também causou prejuízo, visto pela redução do índice de reconhecimento, comparando-se ao grupo controle (p<0,001). Além disso, os grupos submetidos ao ECI tratados com DMF50 e DMF100 (p<0,001) e FLU (p<0,01) foram capazes de reverter este resultado [F (3, 66) = 13,01, P<0,0001] com aumento de 223%, 298% e 126%, respectivamente.

Figura 9 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI.

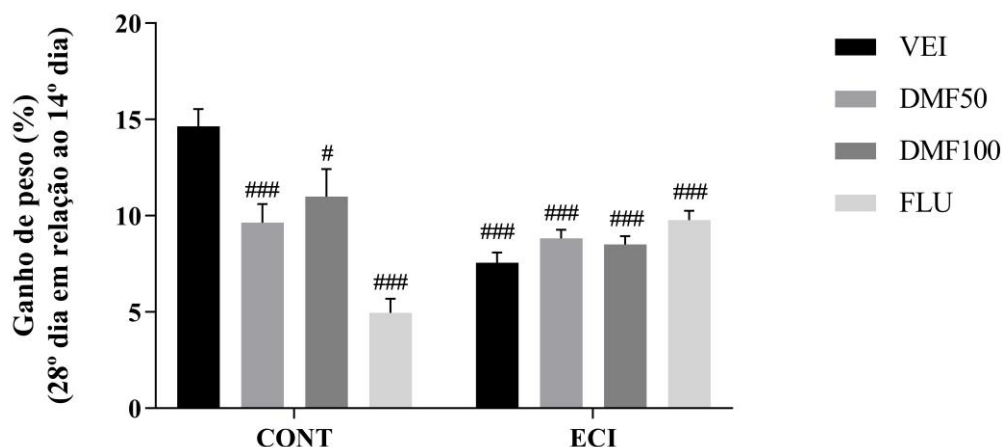


Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste deTukey. Valores significativos: ###p<0,001 vs controle (CONT+VEI), **p<0,01, ***p<0,001 vs ECI+VEI. Abreviações: VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.1.6 Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o ganho de peso em camundongos submetidos ao ECI.

Na avaliação do ganho de peso, observou-se uma interação significativa entre os fatores “modelo ECI” e “tratamento” [F (3,65) = 21,22, p<0,0001]. Do 28º dia em relação ao 14º, houve uma redução no ganho de peso corporal (%) no grupo ECI+VEI em relação ao grupo CONT+VEI, de cerca de 50% (p<0,001). Por outro lado, os grupos tratados submetidos ao ECI não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo ECI+VEI (FIGURA 10).

Figura 10 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50 e 100 mg/kg) sobre o ganho de peso em camundongos submetidos ao ECI.



Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste deTukey. Valores significativos: #p<0,05, ###p<0,001 vs CONT+VEI. Abreviações: VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.2 Testes *ex vivo*

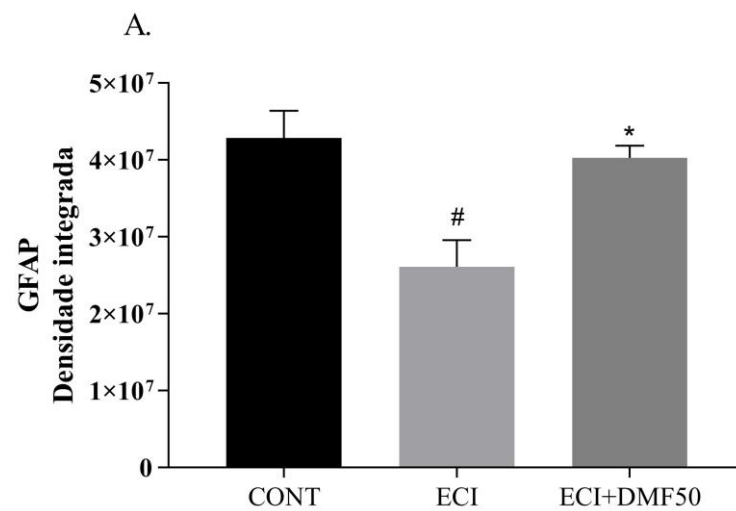
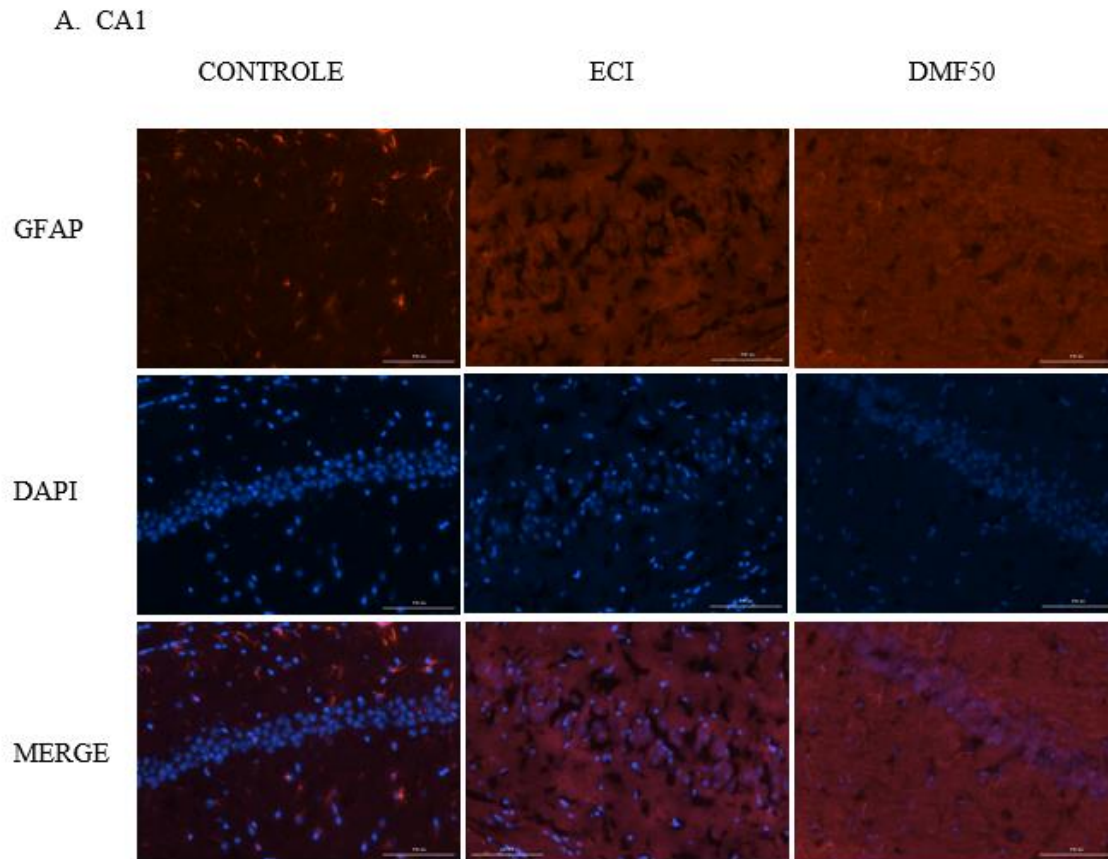
5.2.1 Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão de GFAP em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.

Como nos testes comportamentais não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelas diferentes doses testadas (50 e 100 mg/kg) de DMF, prosseguiu-se para os testes neuroquímicos apenas com a dose mais baixa, ou seja, a dose de 50mg/kg.

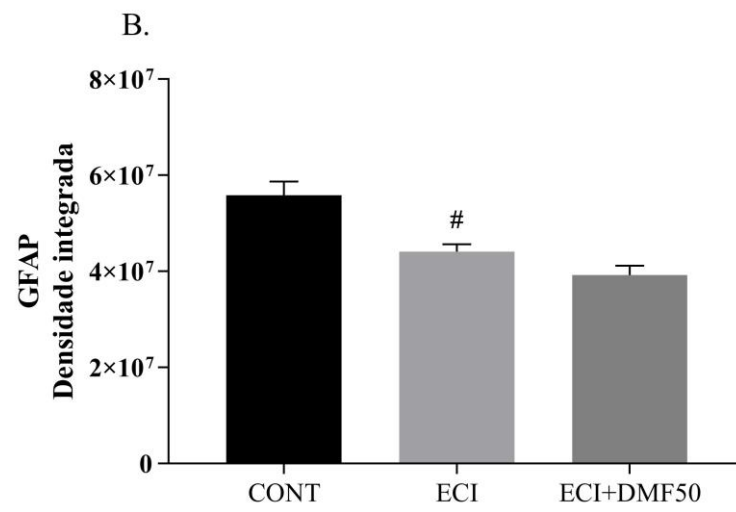
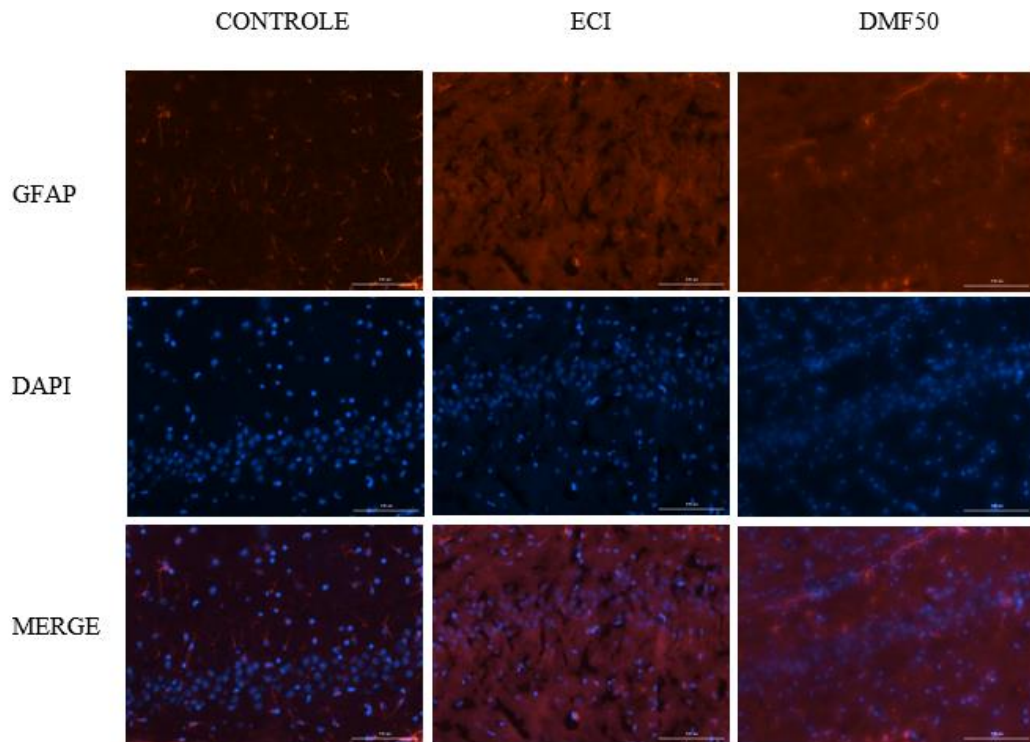
Na área CA1, a expressão de GFAP foi reduzida no grupo ECI em relação ao controle (p<0,05) e o tratamento com DMF50 foi capaz de reverter esta redução (p<0,05), como visto na Figura 11A [F (2, 10) = 8,16, p=0,0079].

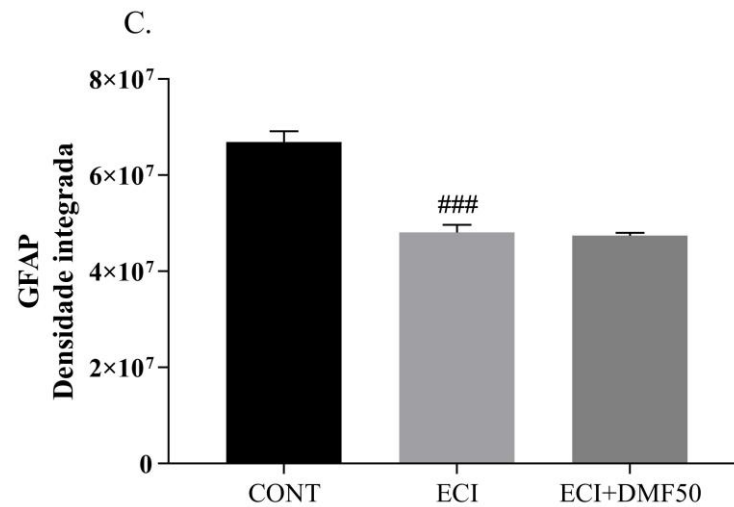
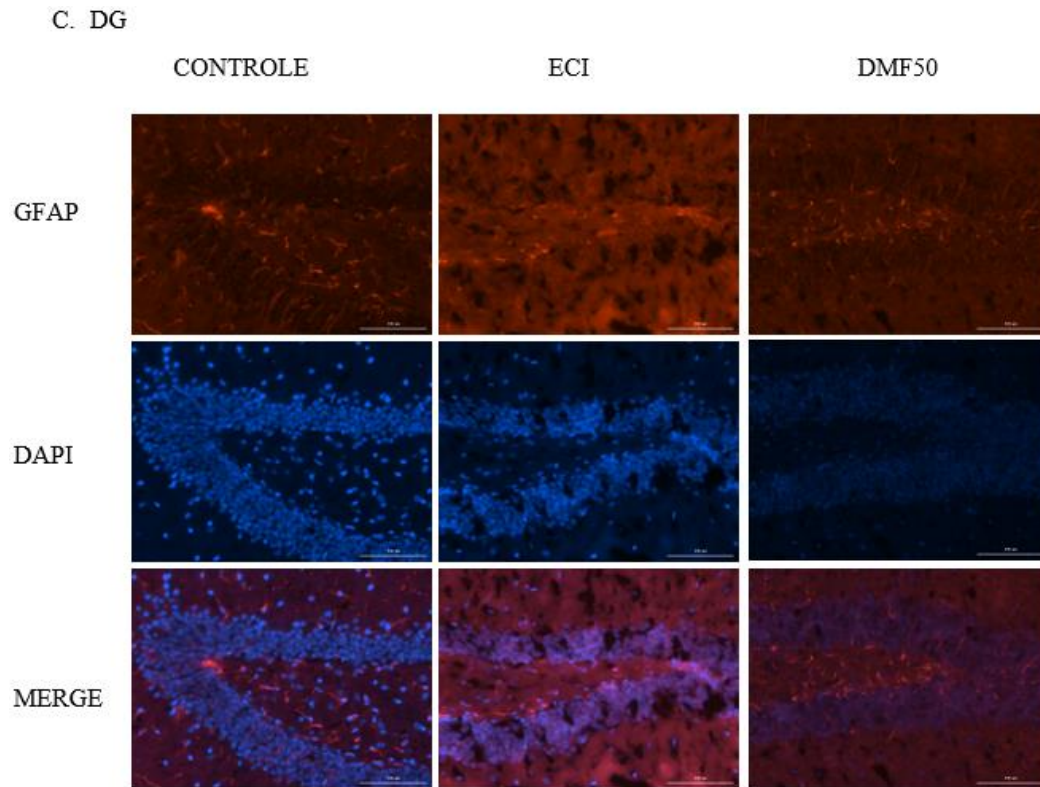
Nas áreas CA3 [F (2, 9) = 12,89, p=0,0023] e DG [F (2, 9) = 4,93, p<0,0001], a expressão de GFAP foi reduzida pelo ECI em comparação ao controle (CA3: p<0,05 e DG: p<0,001), no entanto, o tratamento com DMF50 não interferiu nesse parâmetro, como pode ser visto nas Figuras 11B e 11C, respectivamente.

Figura 11 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão da proteína glial fibrilar ácida em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.



B. CA3



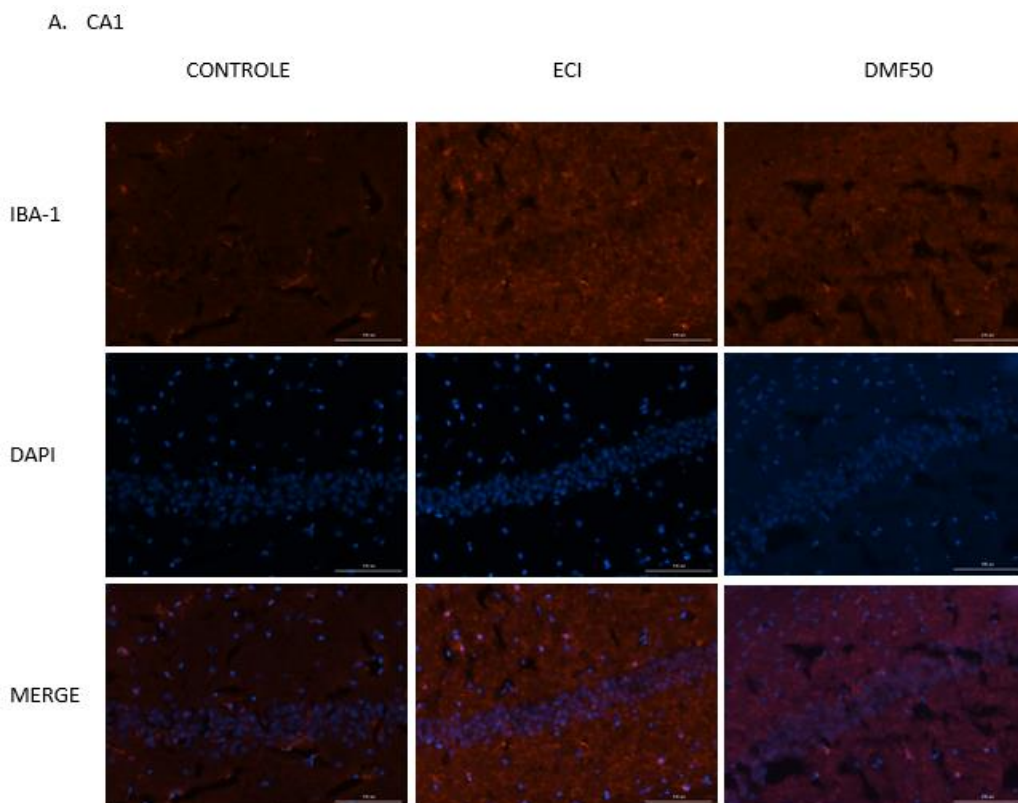


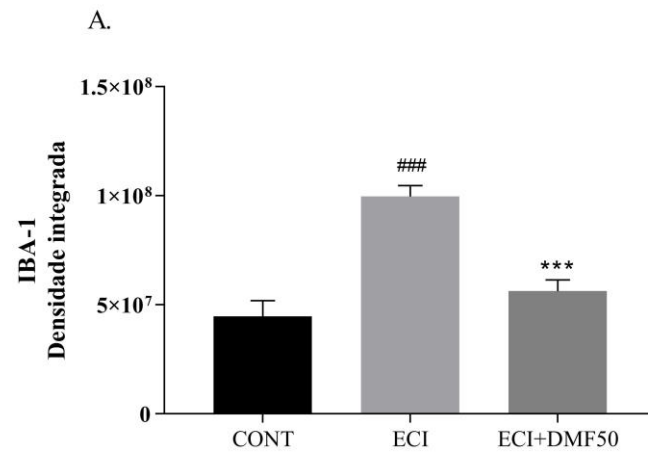
Acima, fotomicrografias representativas do hipocampo *Cornu Ammonis* (CA) subcampos CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (DG) (C) mostrando células coradas apenas para GFAP (em vermelho); núcleos corados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (em azul) e mistura da coloração de GFAP e DAPI (em roxo). Abaixo, a quantificação refere-se à densidade integrada de fluorescência nas respectivas subáreas do hipocampo. Os resultados são expressos como a média ± EPM (n= 4 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ###p <0,001 e #p <0,05 vs CONT e *p<0,05 vs ECI. Abreviações: CONT: controle, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.2.2 Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão de Iba1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.

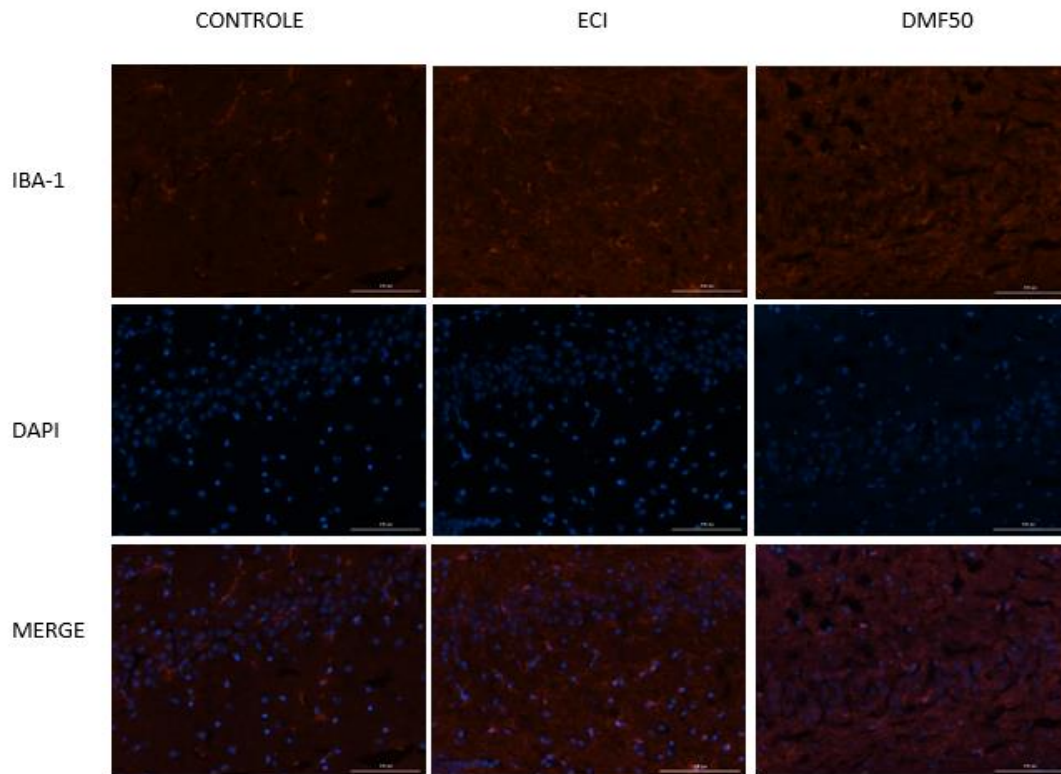
Nas três áreas estudadas CA1 (FIGURA 12A), CA3 (FIGURA 12B) e DG (FIGURA 12C), a expressão de Iba1 foi aumentada no grupo ECI em relação ao controle ($p < 0,001$) e o tratamento com DMF50 foi capaz de reverter este aumento ($p < 0,001$). CA1: $F(2, 13) = 25,89$, $p < 0,0001$, CA3: $F(2, 13) = 31,58$, $p < 0,0001$ e DG: $F(2, 11) = 76,90$, $p < 0,0001$.

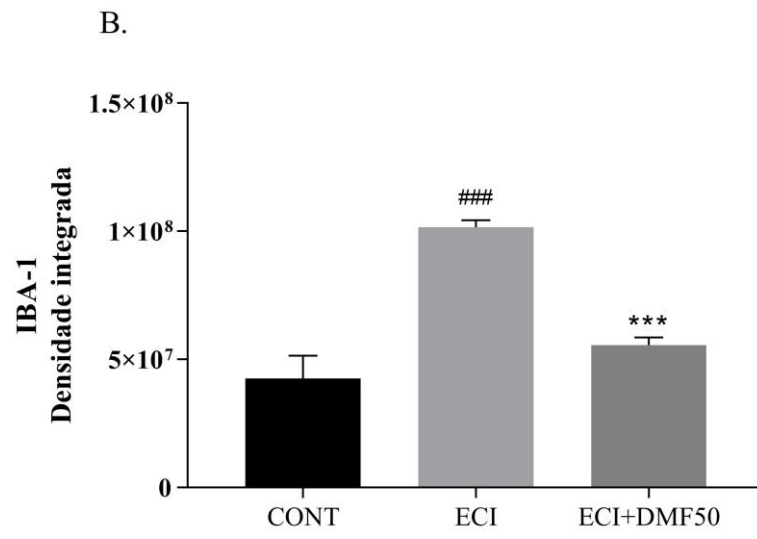
Figura 12 - Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a expressão do marcador de ativação microglial Iba1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.



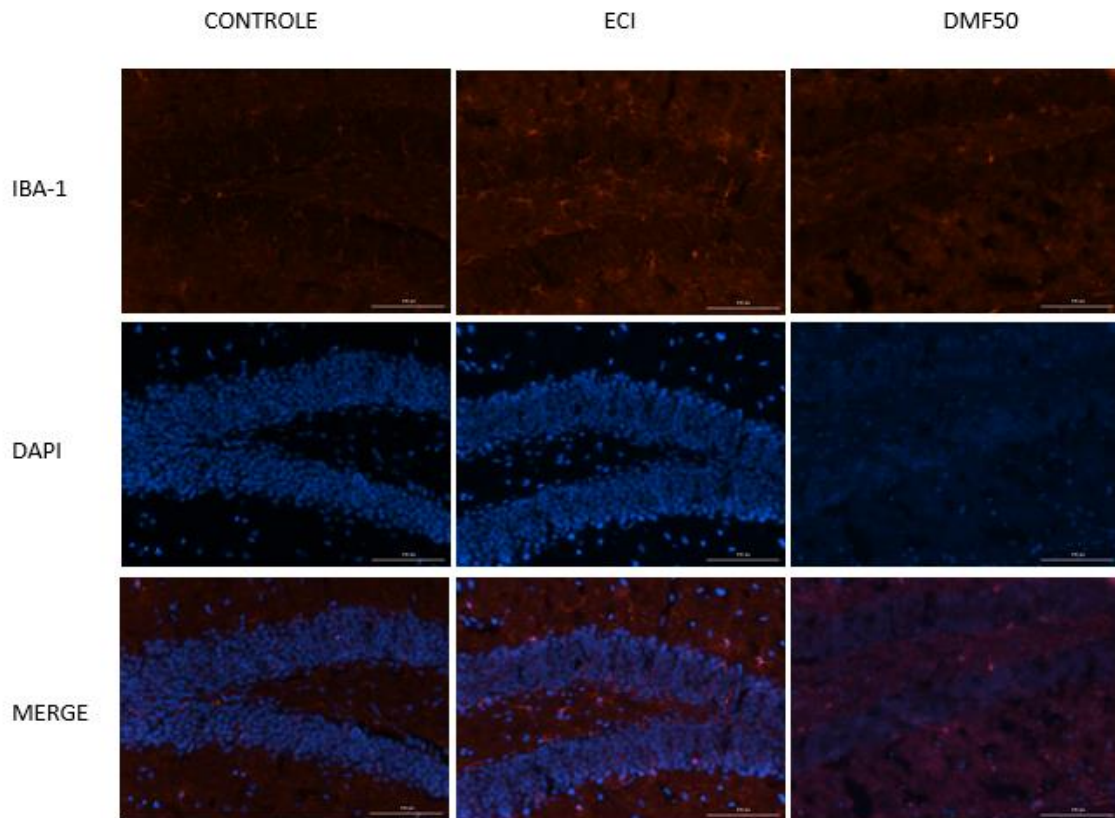


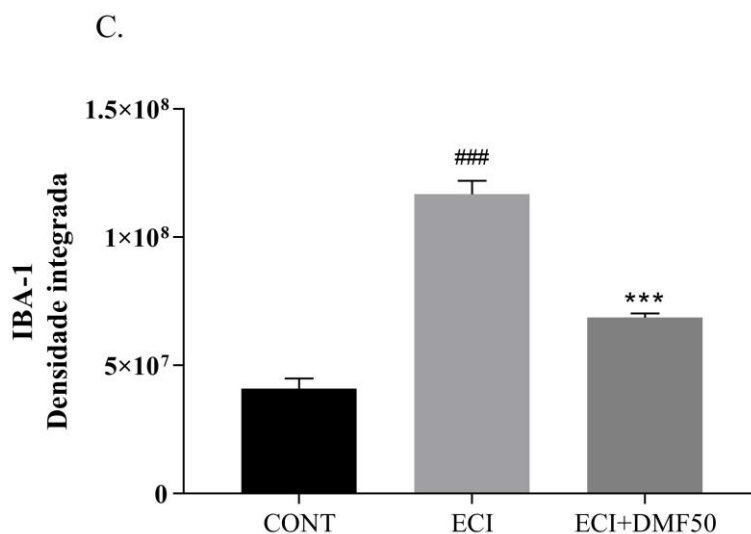
B. CA3





C. DG





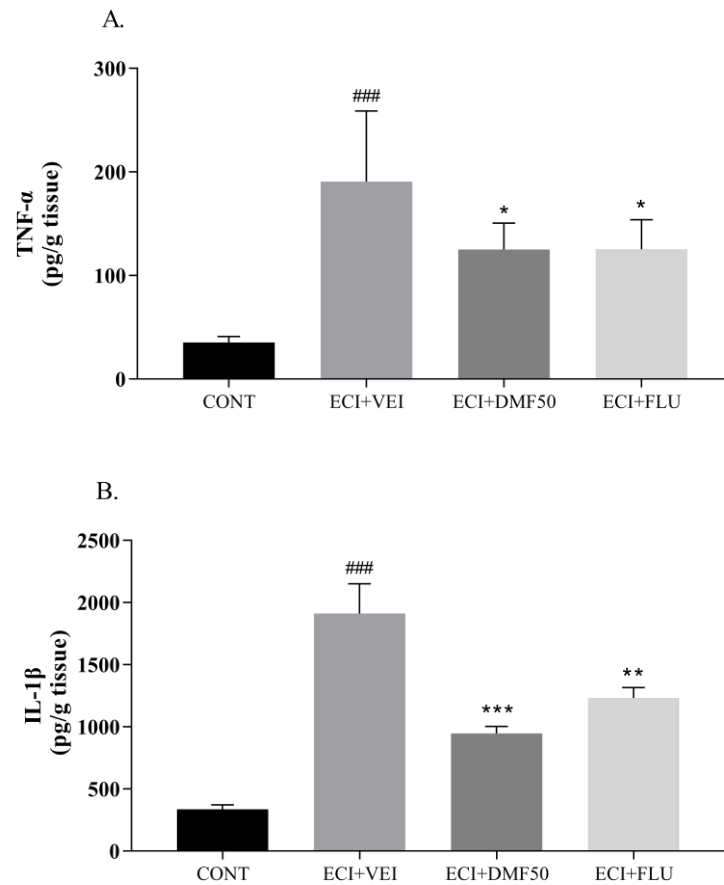
Acima, fotomicrografias representativas do hipocampo *Cornu Ammonis* (CA) subcampos CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (DG) (C) mostrando células coradas apenas para Iba1 (em vermelho); núcleos corados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (em azul) e mistura da coloração de Iba1 e DAPI (em roxo). Abaixo, a quantificação refere-se à densidade integrada de fluorescência nas respectivas subáreas do hipocampo. Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 4 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ###p <0,001 vs CONT e ***p<0,001 vs ECI. Abreviações: CONT: controle, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

5.2.3 Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a concentração de *TNF-α* e *IL-1β* em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.

O ECI induziu aumento na expressão de *TNF-α* em relação ao controle (p<0,001) e os tratamentos com DMF50 e FLU foram capazes de reverter este aumento (p<0,05), como visto na Figura 13A [F (3, 27) = 21,56, p<0,0001].

Da mesma forma, ocorreu aumento de *IL-1β* no grupo ECI comparando-se ao controle (p<0,001), o qual foi revertido pelos tratamentos com DMF50 (p<0,001) e FLU (p<0,01), como visto na Figura 13B [F (3, 28) = 24,91, p<0,0001].

Figura 13 – Efeito da administração de dimetil fumarato (50mg/kg) sobre a concentração de TNF- α e IL-1 β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.



Os resultados são expressos como a média \pm EPM (n= 8 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ###p < 0,001 vs VEI e *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs ECI+VEI. Abreviações: CONT: controle, VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível.

Quadro 1 - Representação esquemática dos efeitos de DMF e FLU sobre o comportamento de camundongos cronicamente estressados

		CONT+ DMF50	CONT+ DMF100	CONT+ FLU	ECI+ VEI	ECI+ DMF50	ECI+ DMF100	ECI+ FLU
Campo aberto	Nº de cruzamentos	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Rearings</i>	-	-	-	↑↑↑ [#]	-	↓*	↓*
	<i>Groomings</i>	-	-	-	↑ [#]	↓*	↓*	-
Nado forçado	Tempo de Imobilidade	-	-	-	↑↑↑ [#]	↓↓↓*	↓↓↓*	↓↓↓*
Preferência pela sacarose	% preferência	-	-	-	↓↓ [#]	↑↑↑*	↑*	-
Labirinto em Y	% alternâncias corretas	-	-	-	↓↓ [#]	-	-	-
Reconhecimento do objeto novo	Índice de reconhecimento	-	-	-	↓↓↓ [#]	↑↑↑*	↑↑↑*	↑↑*
Ganho de peso	%	↓↓↓ [#]	↓ [#]	↓↓↓ [#]	↓↓↓ [#]	↓↓↓ [#]	↓↓↓ [#]	↓↓↓ [#]

Grupos comparados com o grupo controle ([#]) ou estresse crônico imprevisível (*). CONT: controle, VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível. Diminuição (↓); aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (-).

Quadro 2 - Representação esquemática dos efeitos de DMF e FLU sobre marcadores neuroquímicos em hipocampo de camundongos cronicamente estressados

		CONT+ DMF50	CONT+ DMF100	CONT+ FLU	ECI+ VEI	ECI+ DMF50	ECI+ FLU
GFAP	CA1	-	-	-	↓ [#]	↑*	NA
	CA3	-	-	-	↓ [#]	-	NA
	DG	-	-	-	↓↓↓ [#]	-	NA
IBA1	CA1	-	-	-	↑↑↑ [#]	↓↓↓*	NA
	CA3	-	-	-	↑↑↑ [#]	↓↓↓*	NA
	DG	-	-	-	↑↑↑ [#]	↓↓↓*	NA
TNF-α		-	-	-	↑↑↑ [#]	↓*	↓*
IL-1β		-	-	-	↑↑↑ [#]	↓↓↓*	↓↓*

Grupos comparados com o grupo controle ([#]) ou estresse crônico imprevisível (*). CONT: controle, VEI: veículo, DMF 50: dimetil fumarato 50mg/kg, DMF 100: dimetil fumarato 100mg/kg, FLU: fluoxetina, ECI: Estresse Crônico Imprevisível. Diminuição (↓); aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (-); não se aplica (NA).

5.3 Testes *in silico*

5.3.1 *Predição de Alvo*

Para estimar os alvos humanos mais prováveis para os efeitos de proteção do MMF, a estrutura química do MMF foi submetida aos servidores Swiss Target Prediction e Similarity Ensemble Approach (SEA). Esses servidores fizeram a predição das proteínas mais prováveis, com base na similaridade do MMF com as estruturas químicas do banco de dados de compostos ChemMBL, e classificaram as proteínas das mais prováveis para as menos prováveis (TABELAS 2 e 3, respectivamente). Dentre os alvos preditos, foi realizada uma análise crítica para selecionar quais proteínas tem relevância para o presente estudo.

Tabela 2 - Alvos preditos para o MMF, usando o servidor Swiss Target Prediction

Alvo	Probabilidade	Ativos conhecidos (3D/2D)
Hydroxycarboxylic acid receptor 2	1.0	5 / 8
Indolethylamine N- methyltransferase	0.02	0 / 1
Egl nine homolog 3	0.02	2/0
Solute carrier family 22 member 6	0.0	1/0
G protein-coupled receptor 44	0.0	4 / 0
Kynurenine 3- monooxygenase (by homology)	0.0	11/0
Hypoxia-inducible factor prolyl 4- hydroxylase	0.0	2/0
D-amino-acid oxidase	0.0	7/0
Dihydroorotase	0.0	2/0
Carbonic anhydrase IX	0.0	5/0
Lysine-specific demethylase 4D-like	0.0	4/0
Lysine-specific demethylase 4A	0.0	3/0
Lysine-specific demethylase 4D	0.0	2/0
Lysine-specific demethylase 4C	0.0	2/0
D-aspartate oxidase	0.0	1/0
Tyrosine-protein kinase FYN	0.0	1/0
Tyrosine-protein kinase LCK	0.0	1/0
Toll-like receptor 4 (by homology)	0.0	3/0

Lysine-specific demethylase 2A	0.0	4/0
Histone lysine demethylase PHF8	0.0	4/0
Lysine-specific demethylase 5C	0.0	5/0
Flap endonuclease 1	0.0	4/0
Serine/threonine- protein kinase PIM1	0.0	2/0

Fonte: Gfeller; Michelin; Zoete (2013).

Tabela 3 - Alvos preditos para o MMF, usando o servidor Similarity Ensemble Approach

Alvo	Descrição	P	MaxTC
HCAR2	Hydroxycarboxylic acid receptor 2	1.906e-13	1.00
GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	3.592e-27	0.44
FABP1	Fatty acid-binding protein, liver	2.901e-25	0.31
	Tetraspanin	8.837e-25	0.36
FABP2	Fatty acid-binding protein, intestinal	2.22e-16	0.31
PARP15	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP15	1.231e-11	0.34
LPAR2	Lysophosphatidic acid receptor 2	9.317e-10	0.33
Maob	Amine oxidase [flavin-containing] B	1.631e-07	0.29
Tlr4	Toll-like receptor 4	7.511e-07	0.32
LPAR3	Lysophosphatidic acid receptor 3	1.573e-06	0.33
Tdo2	Tryptophan 2,3-dioxygenase	1.938e-06	0.32
BBOX1	Gamma-butyrobetaine dioxygenase	7.334e-06	0.33

Fonte: Keiser et al. (2007).

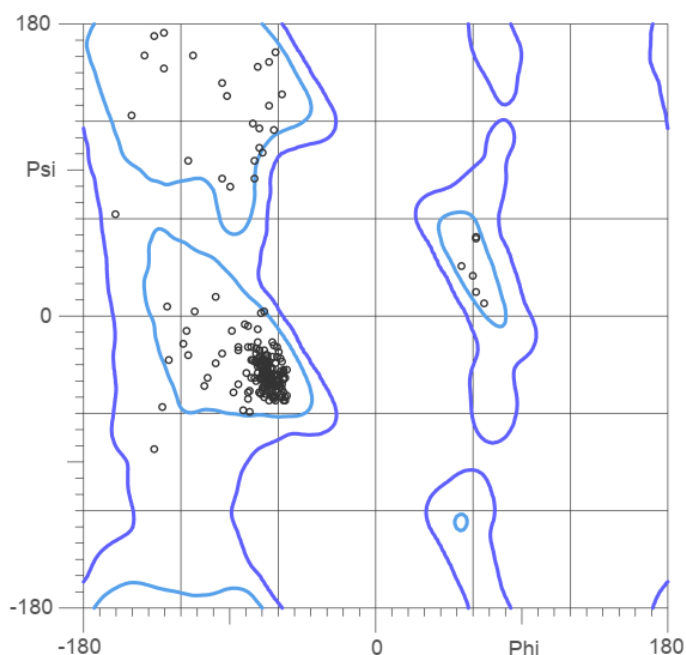
Com base em ambas as predições, a proteína HCAR2 humana foi sugerida como o alvo mais provável para MMF, visto que obteve a maior taxa de probabilidade quantitativa; apresentou ativos conhecidos com propriedades químicas semelhantes, medidos com o Coeficiente de Tanimoto (MaxTC) e similaridade de distância de Manhattan e obteve valor de P significativo. HCAR2 está presente no cérebro de mamíferos (REZQ; ABDEL-RAHMAN, 2016) e possui efeitos anti-neuroinflamatórios (OFFERMANN; SCHWANINGER, 2015). Desta forma, este foi o alvo escolhido para o presente estudo.

De acordo com esses resultados, então foi investigada a interação do MMF com a proteína HCAR2.

5.3.2 Modelagem baseada no alvo

Como não há estrutura 3D da proteína HCAR2 disponível no PDB, primeiramente construímos o modelo 3D da proteína por meio de uma abordagem de modelagem baseada em alvo, usando o servidor I-TASSER. Esse servidor usou uma compilação dos dez principais moldes (4MBS, 4XNW, 4MBS, 5ZBH, 5ZKP, 6IBB, 5ZBH, 6DO1, 4XNV, 4YAY) e gerou um modelo com C-score de -1,71. O C-score é uma pontuação para estimar a qualidade dos modelos previstos pelo I-TASSER, que está normalmente na faixa de [-5,2], onde uma pontuação C de valor mais alto significa um modelo com alta confiabilidade. O modelo foi analisado no servidor MolProbity e mostrou uma pontuação MolProbity de 1,34 (uma pontuação normalizada para estar na mesma escala da resolução de raios-X). A análise do plot de Ramachandran do modelo HCAR2 mostrou que 99,65% dos resíduos estão nas regiões mais favoráveis, o que foi mais do que satisfatório, pois idealmente esse valor deveria ser maior que 98%.

Figura 14 - Gráfico de Ramachandran do modelo HCAR2.



A maioria dos resíduos (representados por pontos) está em 99,65% das regiões favoráveis (azul claro).

5.3.3 Docking molecular

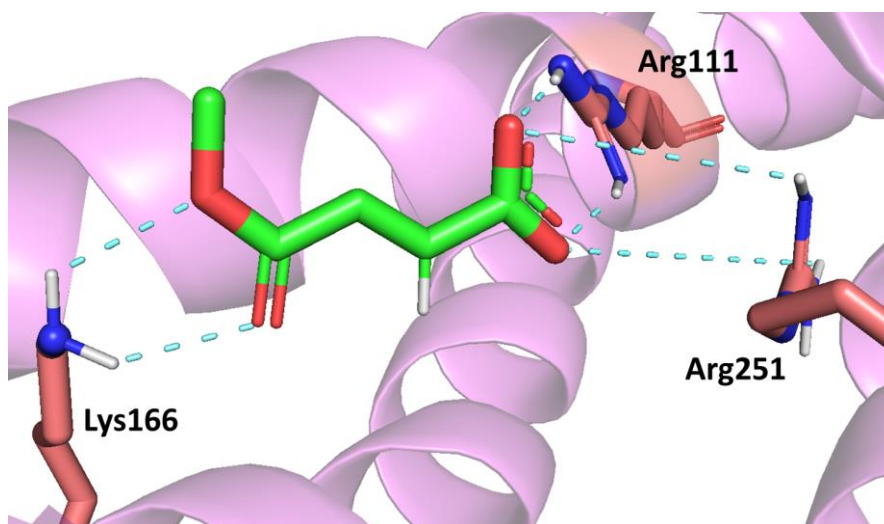
Foram realizados os cálculos de *docking* para os alvos selecionados do MMF, a fim de investigar a afinidade de ligação do MMF contra os alvos, bem como estudar o possível modo de ligação e as interações entre eles. Quanto mais negativa uma pontuação de *docking*, ou seja, quanto menor a energia de afinidade de ligação, mais favorável é a interação de ligação ligante-proteína. Para comparar os escores de *docking* e as interações proteína-ligante, também foram realizados os *dockings* de um ativador de HCAR2 e inibidores de Keap1 conhecidos, usando-os como referência, para pontuações de *docking* e interações proteína-ligante.

5.3.3.1 MMF-HCAR2

O MMF ligou-se ao HCAR2 e apresentou uma pontuação de *docking* (energia de afinidade de ligação) de $-3,51 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. MMF fez interações hidrofóbicas com o resíduo Leu104 e pontes salinas com Arg111, Lys166 e Arg251 (FIGURA 15). O cálculo do *docking* também foi realizado entre a proteína HCAR2 e o ácido nicotínico, um potente ativador de HCAR2, que gerou uma pontuação de *docking* de $-5,69 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. O ácido nicotínico fez interações com o resíduo Arg111 como o MMF fez (através de ponte salina) e, além disso, fez

uma ligação de hidrogênio com a Ser179.

Figura 15 - Modo de ligação predito através de docking molecular entre o MMF e a proteína HCAR2.



Interações intermoleculares 3D do MMF com o modelo de proteína HCAR2 3D, obtidas com cálculos de *docking* molecular. As pontes salinas são mostradas como linhas tracejadas azuis. Cores dos átomos: verde (átomos de carbono do MMF); salmão escuro (átomos de carbono de resíduos de proteínas); vermelho (oxigênio); azul escuro (nitrogênio) e branco (hidrogênio).

5.3.3.2 MMF-Keap1

Além do *docking* com HCAR2, realizou-se o *docking* com a Keap1. Como esta proteína está depositada no Banco de Dados de Proteínas (PDB) (BERMAN et al., 2000), foi utilizada sua estrutura resolvida experimentalmente. Para a seleção da proteína, foram utilizados critérios como: resolução, *R-value free*, *R-value work* e a presença de ligantes (TABELA 4). Resolução é uma medida da qualidade dos dados que foram coletados no cristal que contém a proteína, havendo uma maior confiança na localização dos átomos em estruturas com valores de resolução pequenos, chamadas de "estruturas de alta resolução". O *R-value work* mede o quão bem o padrão de difração simulado com base no modelo construído corresponde ao padrão de difração observado experimentalmente. Um conjunto totalmente aleatório de átomos dará um valor R de cerca de 0,63, enquanto um ajuste perfeito teria um valor de 0. Os valores típicos são cerca de 0,20. Um processo de refinamento é frequentemente usado para melhorar o modelo atômico e, assim, o valor-R. O *R-value free* indica o quão bem o modelo prevê a parte das observações experimentais que não passaram pelo refinamento. O *R-value free* será um pouco mais alto que o *R-value work*, com um valor

de cerca de 0,26. Quanto à presença de ligantes, observa-se que a interação entre estes e a proteína é refletida em um arquivo de dados de entrada e a conectividade entre os resíduos que não está implícita na estrutura primária é registrada, sendo, assim, a conformação da proteína com ligante mais fidedigna (BERMAN et al., 2000).

Com base nesses critérios, os PDBs escolhidos foram o 6HWS para o domínio Kelch e o 5GIT para o domínio BTB. Ambos de *homo sapiens*.

Tabela 4 – Pesquisa no banco de dados de proteínas (PDB) pela estrutura 3D da proteína Keap1

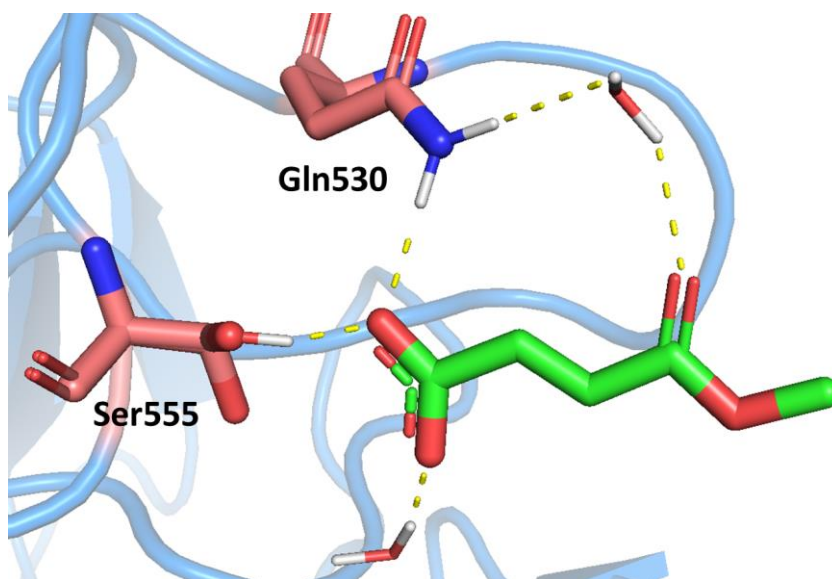
PDB ID	Resolução (Å)	Valor-R	Valor-R livre	Ligantes	Resíduos
DOMÍNIO KELCH					
2FLU	1.5	0.179	0.199	0	301
6HWS	1.75	0.154	0.189	1	289
5FNR	1.89	0.208	0.264	1	288
5FNU	1.78	0.166	0.205	1	289
DOMÍNIO BTB					
4CXI	2.35	0.185	0.255	1	137
6FFM	2.2	0.253	0.293	1	136
5DAF	2.37	0.202	0.233	1	140
5GIT	2.19	0.216	0.278	1	137

Fonte: Berman et al. (2000).

Cálculos de *docking* no domínio Kelch de Keap1 mostraram que o MMF se liga a Kelch com uma pontuação de *docking* de $-2,124 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ e as principais interações foram ligações de hidrogênio com Gln 530, Ser 555 e águas estruturais (FIGURA 16). O cálculo de *redocking* foi executado para validar o método de *docking*. Usando o PDB ID 6HWS, foi realizado o *redocking* do ligante co-cristalizado (derivado de sulfonilamino), inibidor da Keap1 (domínio Kelch) e, assim, ativador do Nrf2. O cálculo de *redocking* (processo pelo qual um ligante co-cristalizado é retirado de sua estrutura cristalina original e acoplado) foi realizado para validar o método de *docking* e verificar se o *docking* foi capaz de recuperar a estrutura e as interações de um complexo conhecido. O ligante co-cristalizado apresentou uma pontuação de *docking* de $-3,970 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ e, assim como o MMF, realizou ligação de hidrogênio com Gln 530, além de ponte salina com Arg415, ligações de hidrogênio com Ser

602, Asn 414, Arg415 e águas estruturais e interações π -stacking com os resíduos Tyr572. O Root Mean Square Deviation (RMSD) calculado para o ligante derivado de sulfonilamino foi de 1,85Å. O RMSD quantifica e compara a pose do ligante com a pose do ligante co-cristalizado. Valores de RMSD abaixo de 2,0 Å indicam estruturas semelhantes e, portanto, confiabilidade do resultado docking.

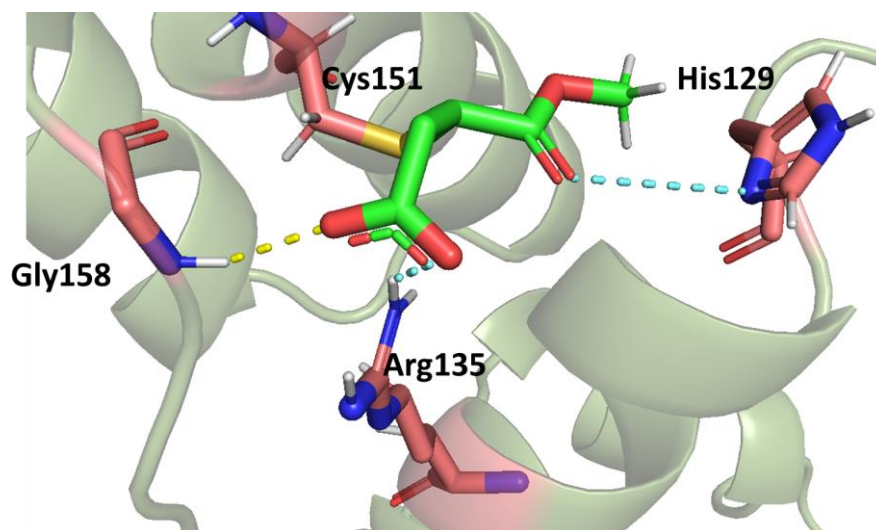
Figura 16 - Modo de ligação previsto entre o MMF e o domínio Kelch de Keap1



Interações intermoleculares 3D do MMF com o domínio Kelch de Keap1, obtidas com cálculos de *docking* molecular. As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas amarelas. Cores dos átomos: verde (átomos de carbono do MMF); salmão escuro (átomos de carbono de resíduos de proteínas); vermelho (oxigênio); azul escuro (nitrogênio) e branco (hidrogênio).

Por sua vez, a ligação do MMF ao domínio BTB apresentou um *docking* score de $-3,05 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ e as principais interações foram ligações de hidrogênio com o resíduo Gly158 e pontes salinas com a Arg135, além disso houve uma ligação covalente com o resíduo Cys151 (FIGURA 17). O cálculo do *redocking* foi realizado com o PDB 5GIT e o ligante co-cristalizado britanina (ID XXT), um potente indutor do sistema Nrf2. A britanina apresentou um *docking* score de $-3,81 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, semelhante ao valor de MMF-BTB. O ligante fez uma ligação covalente com o resíduo Cys151, bem como o MMF, e uma ligação de hidrogênio com Tyr85. O RMSD foi de 0,43 Å, validando, assim, o método de *docking*.

Figura 17 - Modo de ligação previsto entre o MMF e o domínio BTB de Keap1



Interações intermoleculares 3D do MMF com o domínio BTB de Keap1, obtidas com cálculos de *docking* molecular. As ligações de hidrogênio são mostradas como linhas amarelas e as pontes salinas como linhas tracejadas azuis. Cores dos átomos: verde (átomos de carbono do MMF); salmão escuro (átomos de carbono de resíduos de proteínas); vermelho (oxigênio); amarelo (enxofre); azul escuro (nitrogênio) e branco (hidrogênio).

5.3.3.3 Eficiência dos ligantes

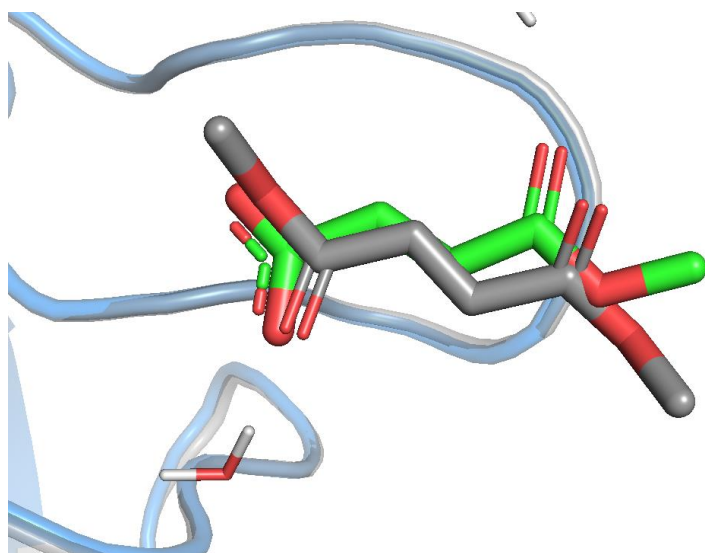
Como os compostos estudados apresentam pesos moleculares diferentes, calculou-se a relação entre a afinidade de ligação (*docking score*) e o número de átomos pesados (TABELA 5), por meio da métrica de Eficiência do Ligante (EL) (ABAD-ZAPATERO, 2007). EL normaliza a afinidade em relação ao número de átomos. A eficiência do ligante é calculada dividindo a afinidade de ligação (ΔG) pelo número de átomos não hidrogênio (n), de acordo com a Equação 1:

$$EL = \Delta G/n \quad (1)$$

Os valores de EL amplamente aceitos para fármacos orais variam de 0,3 a 0,5 $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{átomo não-hidrogênio}^{-1}$ (ABAD-ZAPATERO, 2007; KESERÜ; MAKARA, 2009). MMF apresentou melhores valores de LE (de 0,24 a 0,39 $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{átomo não-hidrogênio}^{-1}$) em comparação com ácido nicotínico, derivado de sulfonilamino e britanina, sugerindo que foi mais eficiente na ligação ao HCAR2 e aos domínios Kelch BTB da Keap1, respectivamente. Como o MMF é um composto de baixo peso molecular, considerado um fragmento (peso molecular ≤ 300 Da), ele pode se ligar facilmente a diferentes locais da proteína.

Recentemente, uma nova estrutura cristalina de *Mus musculus* Keap1 (Kelch) (PDB ID 6LRZ) complexada com três moléculas de DMF, com boa resolução, foi lançada no *Protein Data Bank* (UNNI et al. 2021). Comparando e superpondo essa estrutura cristalográfica com o *docking* calculado de Kelch-MMF humano realizado neste trabalho, observou-se que as moléculas de MMF e DMF adquirem orientação e conformação semelhantes (FIGURA 18). O RMSD dos ligantes foi de 2 Å, indicando que o acoplamento de Kelch-MMF resultou em uma pose muito semelhante ao Kelch-DMF experimental.

Figura 18 - Alinhamento do MMF- Keap1 / Kelch com o cristal DMF- Keap1 / Kelch



Alinhamento do MMF-Keap1/Kelch com o cristal DMF-Keap1/Kelch, em cinza. Cores dos átomos: verde (átomos de carbono do MMF); vermelho (oxigênio).

Tabela 5 - Resultados de *docking* contra alvos selecionados de MMF e eficiência dos ligantes

Alvo	Composto	Fórmula Molecular	Docking score (Kcal·mol⁻¹)	n	EL (Kcal·mol⁻¹·átomo não-hidrogênio⁻¹)
HCAR2	MMF	C ₅ H ₅ O ₄ ⁻	-3.51	9	0.39
	Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	-5.69	9	0.63
Kelch da Keap1	MMF	C ₅ H ₅ O ₄ ⁻	-2.124	9	0.24
	Derivado de sulfonilamino	C ₃₁ H ₃₀ N ₂ O ₁₁ S ₂	-3.970	76	0.09
BTB da Keap1	MMF	C ₅ H ₅ O ₄ ⁻	-3.05	9	0.33
	Britanina	C ₂₈ H ₃₀ N ₄ O ₆ S	-3.81	39	0.09

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

O estresse crônico é um fator precipitante para a depressão, e as mudanças em diversos sistemas corporais que ocorrem na depressão são semelhantes aos observados em resposta ao estresse (FARHAN et al., 2014). Assim, o Estresse Crônico Imprevisível é um promissor modelo para a triagem de compostos com potencial efeito antidepressivo.

Para avaliar comportamentos do tipo depressivo foram realizados os testes do nado forçado e de preferência por sacarose. No primeiro teste foi observado aumento significativo no tempo de imobilidade do grupo ECI em relação ao grupo controle, o que corrobora com outros achados (ABD EL-FATTAH et al., 2018; ALI et al., 2017; LIU et al., 2019a). Este aumento é indicativo de comportamento depressivo-símile, encarado como uma apatia do animal numa situação na qual ele precisa lutar pela vida. Os grupos submetidos ao ECI, tratados com FLU, DMF 50 e DMF 100, mostraram resultados de tempo de imobilidade reduzidos em comparação ao grupo ECI ($p < 0,001$), inferindo reversão do comportamento depressivo-símile, o que está de acordo com o trabalho de Abd El-Fattah et al. (2018).

Além disso, foi encontrada redução no índice de preferência por sacarose (%) do grupo ECI, comparando-se ao controle, comprovando os resultados de trabalhos anteriores (ABD EL-FATTAH et al., 2018; LIU et al., 2019a; SHARMA; THAKUR, 2015). Esta redução também sugere comportamento depressivo-símile, pois é indicativo de anedonia, visto que o animal não busca situações prazerosas. O DMF (50 e 100) foi capaz de reverter significativamente a redução no índice de preferência por sacarose encontrada no grupo ECI ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente), corroborando com Abd El-Fattah et al. (2018). Este resultado ainda reafirma o encontrado no teste do nado forçado, visto que em ambos os testes, o DMF demonstrou significativo efeito do tipo antidepressivo-símile.

Com relação à atividade locomotora, avaliada pelo teste Campo Aberto, não houve diferenças significativas no número de cruzamentos entre os grupos estudados, o que corrobora com os achados de Liu et al. (2019a) e Campolo et al. (2017). Dessa forma, pode-se inferir que as diferenças de imobilidade encontradas entre os grupos no teste do nado forçado não se devem a alterações na atividade locomotora.

Quanto aos comportamentos ansiedade-símile analisados no teste do campo aberto, percebe-se que o grupo ECI teve aumento do número de *rearings*, em comparação ao grupo controle e o tratamento com FLU e DMF100 foi capaz de reverter este efeito. Este resultado vai ao encontro do trabalho de Ali et al. (2017), que também mostrou aumento deste parâmetro no grupo ECI, e redução após tratamento com fluoxetina.

Como já sugerido na literatura (PAPALEO et al., 2011; SHMELKOV et al., 2010), as respostas de *groomings* em camundongos podem representar traços altamente relevantes para esquizofrenia, ansiedade e depressão, visto que o aumento de auto-limpeza em roedores costuma ser consistente com respostas de estresse e fenótipos ansiedade-símile. Nossos resultados corroboram com esse achado, já que o grupo ECI apresentou aumento deste parâmetro em relação ao controle. Audet e Goulet (2006) verificaram que ratos submetidos a tratamento repetido com fenciclidina passaram mais tempo se limpando, em resposta a estímulos estressantes, do que controles. Por sua vez, Fajemiroye et al. (2015) mostraram que o metil fumarato foi capaz de diminuir o número de *groomings* em relação ao controle depressivo e no presente trabalho o DMF apresentou o mesmo efeito.

Como o fenótipo tipo ansiedade/depressão está associado ao déficit cognitivo (DARCET et al., 2014), foram realizados testes de memória. No labirinto em Y, houve prejuízo da memória, observado pela redução na porcentagem de alternâncias corretas, no grupo ECI+VEI. No entanto, os tratamentos com DMF e FLU não foram capazes de reverter este resultado significativamente, embora tenham aumentado o percentual de alternâncias corretas em cerca de 13%. Além disso, em busca nas bases de dados científicas, não foram encontrados estudos que tenham realizado o labirinto em Y em camundongos submetidos ao ECI, sendo o presente trabalho pioneiro. Enquanto o NOR é usado para mensurar a memória cognitiva de objetos, o labirinto em Y está associado à memória espacial de curto prazo (IBI; SUZUKI; HIRAMATSU, 2018). O ECI causou prejuízo da memória espacial no teste Water Maze de Morris (LI et al., 2019; ZOU et al., 2020), resultado que corrobora com o presente trabalho.

No NOR, também foi observada redução do índice de reconhecimento no grupo ECI, o que corrobora com outros achados da literatura (SHEHU et al., 2019; VENKATESH; SANKAR; RAMATHAN, 2019), onde também foi observado menor tempo de exploração no objeto novo em relação ao antigo pelo grupo estressado, o que é indicativo de comprometimento da memória. Até o presente momento, não há estudos que demonstrem o efeito do DMF e da FLU em camundongos submetidos ao ECI no teste de reconhecimento de objetos. Neste estudo, os grupos submetidos ao ECI tratados com FLU, DMF 50 e DMF 100 tiveram reversão da redução no índice de reconhecimento. O aumento provocado pelo DMF foi significativamente maior do que o causado pela FLU, evidenciando que este apresentou efeito mais benéfico na reversão do déficit cognitivo causado pelo ECI.

Com relação ao ganho de peso corporal, o ECI induziu uma redução neste parâmetro em relação ao grupo controle, o que é consistente com outros relatos (WANG et al., 2015; ZHU et al., 2015), enquanto que os grupos tratados não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo ECI. Uma possibilidade é que o DMF e a FLU, *per se*, reduzam o peso corporal, visto que os grupos controles destes fármacos (DMF e FLU) já apresentaram redução do peso corpóreo em relação ao grupo que recebeu somente o veículo que não foi submetido ao ECI (CONTROLE). Tais achados corroboram com os trabalhos de Lu et al. (2017), o qual relata redução de peso nos camundongos tratados com DMF, através da ativação do Nrf2 e Wang et al. (2020) no qual a fluoxetina também não foi capaz de reverter a redução de peso causada pelo ECI.

Como nos testes comportamentais não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelas diferentes doses testadas (50 e 100 mg/kg) de DMF, prosseguiu-se para os testes neuroquímicos apenas com a dose mais baixa, ou seja, a dose de 50mg/kg. Mensurou-se a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), o principal componente dos filamentos intermediários do citoesqueleto dos astrócitos (MIDDELDORP; HOL, 2011).

Há divergências na literatura com relação à resposta astrocitária à depressão. Miguel-Hidalgo et al. (2000) demonstraram uma diminuição significativa na densidade de astrócitos (fração de área GFAP) na substância cinzenta do córtex pré-frontal em indivíduos deprimidos mais jovens. Em contraste, indivíduos mais velhos mostraram aumento na fração de área GFAP no córtex pré-frontal, o que pode refletir uma reação compensatória ao dano neuronal no TDM (RAJKOWSKA et al., 2005).

Muller et al. (2001) detectaram redução dos astrócitos (através do GFAP) no *Corno Ammonis* (CA), subáreas CA1 e CA2, do hipocampo de pacientes com depressão. Esses resultados também são demonstrados em estudos pré-clínicos, nos quais modelos animais de comportamento tipo depressivo, envolvendo vários tipos de estresse, causam reduções astrocitárias no hipocampo (CZÉH et al., 2006; LEVENTOPOULOS et al., 2007).

Neste trabalho, a expressão de GFAP foi reduzida pelo ECI em comparação ao controle nas três áreas do hipocampo estudadas, CA1, CA3 e giro dentado. O tratamento com DMF reverteu esta redução apenas no CA1. Uma possível explicação para isso é que os neurônios do CA1 possuem uma maior sensibilidade a insultos, como isquemia, inflamação ou excitotoxicidade (PRENDERGAST et al., 2000), do que CA3 e giro denteado (LAHTINEN et al., 2001). Ugolini et al. (2018), utilizando um modelo de Alzheimer, verificaram que a astrogliose foi maior em CA1, bem como as tríades neurônio-astrócitos-microglia foram mais numerosas em CA1 do que em CA3. Astrócitos e microglia, formando

tríades com neurônios, ajudam a limpar neurônios apoptóticos e degenerados em maior grau em CA1, em comparação com CA3.

Em relação ao tratamento com antidepressivos, alguns estudos mostram que estes podem reverter a redução de GFAP provocada pelo estresse (BANASR et al., 2010; CZÉH et al., 2006). No entanto, um tratamento de quatro semanas com citalopram não reverteu a redução na proteína GFAP no hipocampo de ratos submetidos ao estresse por derrota social, embora o comportamento dos animais tenha sido normalizado com o tratamento (ARAYA-CALLÍS et al., 2012).

Estudos *ex vivo* de modelos neurodegenerativos para doença de Parkinson e isquemia cerebral revelaram que a neuroproteção mediada por Nrf2 pode não ser mediada apenas diretamente, mas envolve criticamente os efeitos via astrócitos (CHEN et al., 2009; KRAFT; JOHNSON; JOHNSON, 2004).

Esse achado é ainda mais enfatizado pela observação de que a expressão de NQO1, uma enzima regulada por Nrf2 envolvida na desintoxicação celular, está predominantemente presente nas células gliais. Uma vez que o NQO1 é um dos vários genes envolvidos na resposta antioxidante do tecido, sua regulação positiva é representativa de uma parte da cascata antioxidante que desempenha um importante papel nos efeitos do dimetil fumarato na Encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo animal de inflamação do cérebro. Camundongos *knockout* para Nrf2 sofrem de EAE mais grave com aumento do dano oxidativo no SNC, levando a uma desmielinização intensificada e uma perda axonal mais pronunciada. Esses dados são consistentes com os efeitos do tratamento com dimetil fumarato em EAE, o qual pode levar à ativação direta de Nrf2 e consequente neuroproteção, não apenas em diferentes populações neuronais, mas também em oligodendrócitos e astrócitos. Em contraste, este efeito protetor não está presente em camundongos *knockout* para Nrf2, fornecendo evidências para o efeito funcional do dimetil fumarato ser dependente de Nrf2 (JOHNSON et al., 2010).

Até o momento, não foram encontrados estudos que tenham avaliado a resposta astrocítica ao DMF em modelo de depressão. No entanto, Liu et al. (2019b) mostraram que o tratamento com dimetil fumarato foi capaz de aumentar significativamente o número total de células GFAP-positivas no córtex e estriado de camundongos em comparação com o grupo controle submetido a um modelo de isquemia-hipóxia, o que corrobora com os nossos resultados. Esses achados indicam que a ativação de Nrf2 desempenha um papel substancial na ativação e proliferação astrocítica que impactam a preservação do tecido e o resultado funcional, apoiando que a astrogliose reativa proliferativa pode contribuir para a

neuroproteção através do pré-tratamento com DMF. Sugere-se, assim, que este seja um dos mecanismos pelos quais o DMF tenha levado aos efeitos comportamentais benéficos observados no presente estudo, como redução do tempo de imobilidade, aumento da preferência por sacarose, redução de *rearings* e *groomings* e aumento do índice de reconhecimento de objetos.

Devido ao seu papel fundamental no controle da resposta antioxidante celular, a regulação positiva de Nrf2 foi sugerida como um alvo terapêutico comum de várias doenças aparentemente não relacionadas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla e diabetes mellitus tipo 2 (DAVID et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2019), sob o conceito frequentemente descrito como "várias doenças, um medicamento" (CUADRADO et al., 2018). De fato, a regulação positiva induzida deste fator de transcrição provou ser relativamente bem-sucedida em fornecer alívio sintomático e modificar processos de doença em esclerose múltipla (GOLD et al., 2012; LINKER et al., 2011) e em doenças metabólicas, como obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2, por meio do uso de DMF e sulforafano, respectivamente (DA COSTA et al., 2019; PATEL; MANN; CHAPPLE, 2018). Outras moléculas nesta categoria incluem N-acetilcisteína, coenzima Q10 e melatonina. A evidência sugere que esses suplementos podem atenuar os sintomas em pelo menos alguns indivíduos que sofrem de doenças neuropsiquiátricas (WANG et al., 2016).

Diversas pesquisas relataram que a melatonina foi capaz de modular negativamente a inflamação em modelos animais de neuroinflamação crônica através da indução de astrogliose reativa (ALI et al., 2018; PERMPOONPUTTANA et al., 2018; SINGHAKUMAR et al., 2015) e da mudança na polarização da microglia ativada do fenótipo pró-inflamatório ou M1 para o anti-inflamatório ou estado M2 (HU et al., 2019; ZHENG; WONG, 2019).

A ativação microglial é um mediador chave dos processos neuroinflamatórios (TRONEL et al., 2017), e a neuroinflamação desempenha um papel crucial na patogênese da depressão (ZHANG et al., 2019). A ativação microglial hipocampal promove a liberação de fatores inflamatórios, o que resulta na interrupção da neuroplasticidade e em comprometimento cognitivo, contribuindo, assim, para o desenvolvimento da depressão (SINGHAL; BAUNE, 2017; WALKER; NILSSON; JONES, 2013). Sugere-se que esta seja uma explicação para os resultados comportamentais encontrados, visto que no presente trabalho, a expressão de Iba1 foi aumentada pelo ECI em comparação ao controle nas três áreas do hipocampo estudadas, CA1, CA3 e giro dentado, e o tratamento com DMF foi capaz de reverter este aumento da ativação microglial.

Fan et al. (2018) mostraram que a morfologia da microglia do córtex pré-frontal de ratos submetidos ao ECI demonstrou alterações em comparação com a de ratos não estressados, caracterizada pelo aumento do soma e retração do processo ramificado. Além dessas mudanças morfológicas, o ECI aumentou significativamente o número de células Iba1 positivas em comparação com o grupo controle não estressado ($P < 0,001$), corroborando com nossos resultados.

É bem conhecido que o tratamento com antidepressivos de diferentes classes farmacológicas podem proteger o cérebro contra danos associados à reatividade da microglia e superprodução de citocinas induzido por estresse crônico (BROOKS et al., 2017; LU et al., 2017). Animais tratados com dimetil fumarato mostraram menos células da microglia ativadas na região peri-hematoma em comparação com os animais tratados com veículo, em modelo de hemorragia intracerebral (INIAGHE et al., 2015). Até o momento, não há estudos que tenham avaliado a resposta microglial ao DMF em modelo de depressão, sendo o presente estudo pioneiro. Nossos resultados mostram que o DMF reduziu a ativação microglial, corroborando com os resultados de Iniaque et al. (2015).

A microglia ativada com estímulos internos ou externos produz e secreta citocinas e outros mediadores da inflamação (BACHILLER et al., 2018). O aumento na expressão dos níveis de TNF- α e IL-1 β no hipocampo de ratos expostos a ECI é bem descrito na literatura (ABD EL-FATTAH et al., 2018; ZOU et al., 2020). A elevação dos níveis hipocámpais dessas citocinas, provocada pelo ECI, foi inibida pelo DMF no presente estudo. Nossos resultados corroboram com Abd El-Fattah et al. (2018) e Quan et al. (2015) que demonstraram que a inibição desses mediadores inflamatórios exerceu ação terapêutica no comportamento semelhante à depressão induzido por ECI em ratos.

O TNF- α é um mediador pró-inflamatório crucial produzido pela glia, principalmente a microglia, logo após um desafio imunológico. Essa citocina está envolvida no início e na manutenção da ativação da glia em um ciclo de *feedback* positivo (LIVELY; SCHLICHTER, 2018). O TNF- α é também um dos principais fatores relacionados à apoptose neuronal mediada pela microglia (GUADAGNO et al., 2013).

Estudos clínicos também mostraram que o aumento de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-6, IL-1 β e TNF- α , podem estar associados com a iniciação, recaída e progressão da depressão (ADZIC et al., 2017; YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014). Uma meta-análise revelou que em pacientes deprimidos os níveis plasmáticos de IL-1 β diminuíram significativamente após o tratamento com antidepressivos, enquanto os níveis de IL-6 apresentaram uma ligeira diminuição (HANNESTAD; DELLAGIOIA; BLOCH, 2011).

A produção de citocinas pró-inflamatórias é induzida pela ativação do NF- κ B, por sua fosforilação na subunidade p65 (NF- κ B p65). A ativação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) antagoniza as alterações pró-inflamatórias e oxidativas induzidas por NF- κ B p65 (SNOW; ALBENSI, 2016).

O NF- κ B, via inibidor do fator nuclear kappa-B cinase subunidade beta (IKK β), induz uma superexpressão do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que leva a um aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) que contribuem para a síntese de ROS (AKTAN, 2004), resultando em neurotoxicidade e neurodegeneração (INSERRA et al., 2019). Além disso, o NO interfere com produção de monoaminas e transporte pré-sináptico, diminuindo a disponibilidade de aminas inter-sinápticas (SANDOR et al., 1995).

Vários grupos de pesquisa também relataram uma associação entre a suplementação oral de acetilcisteína, indutor do Nrf2, e diminuição dos níveis cerebrais de NO provavelmente resultantes da inibição de NF- κ B e iNOS (GARCÍA-ROMAN et al., 2008; WHITEHEAD et al., 2008).

A ativação de Nrf2 mediada por xenobióticos pode ser promovida por dois mecanismos principais: interrupção da interação domínio Kelch / Nrf2 (DAVIES et al., 2016) e ligação covalente a resíduos cisteína do domínio Keap1-BTB (HUERTA et al., 2016). Desta forma, realizou-se o *docking* molecular do MMF nestes dois domínios.

O *docking* MMF-Keap1/Kelch mostrou algumas interações semelhantes a um inibidor da Keap1 / Kelch (derivado de sulfonilamino), enquanto a pontuação de *docking* do MMF foi maior (menos favorável) do que a do derivado de sulfonilamino. No entanto, comparando o valor EL do MMF e do derivado de sulfonilamino (TABELA 5), o MMF apresentou um EL melhor, sugerindo superioridade de eficiência de ligação ao domínio Kelch, levando-se em conta seu baixo peso molecular.

Por sua vez, o *docking* covalente MMF-Keap1 / BTB gerou uma pontuação de *docking* muito semelhante a um inibidor Keap1 / BTB potente e interações semelhantes, inclusive a ligação covalente ao resíduo Cys151 ocorreu em ambos. Os cálculos de *docking* sugeriram que o MMF se liga ao domínio BTB da Keap1 com interações proteína-ligante semelhantes e *docking* score semelhante comparativamente ao inibidor britanina. Os valores de EL do MMF e britanina (TABELA 5) mostraram que o MMF é mais eficiente na ligação ao BTB do que a britanina. Isso indica que Keap1 pode ser um alvo promissor do MMF, com a ligação do MMF ao domínio BTB da proteína, de forma que o Nrf2 não sofreria ubiquitinação e migraria para o núcleo, regulando a expressão de enzimas anti-inflamatórias. Os cálculos de *redocking*, realizados para ambos os domínios do Keap1, apresentaram um RMSD abaixo de

2,0 Å, indicando a confiabilidade dos cálculos de *docking*.

Por outro lado, foi demonstrado que alguns efeitos imunológicos e clínicos do DMF são independentes de Nrf2 (SCHULZE-TOPPHOFF et al., 2016). Assim, percebeu-se que existem outras vias pelas quais o DMF produz seu efeito anti-inflamatório. Dessa forma, para descobrir essas vias alternativas e compreender melhor o mecanismo molecular envolvido no efeito antidepressivo e anti-inflamatório do DMF, realizou-se a predição de alvos e detectou-se a proteína HCAR2 como alvo mais provável.

O DMF mostrou ter efeitos benéficos no tratamento da psoríase e esclerose múltipla (KAPPOS et al., 2008). Além disso, o tratamento oral com DMF reduziu os déficits neurológicos e a desmielinização da medula espinhal em camundongos submetidos à EAE aguda, um modelo inflamatório de esclerose múltipla. Estes efeitos foram parcialmente abolidos em camundongos deficientes para HCAR2, mostrando que a ação do DMF é dependente desta proteína (CHEN et al., 2014).

Além disso, uma infiltração reduzida de neutrófilos foi observada em resposta ao DMF, que não foi observada em camundongos sem HCAR2, e que pode ser explicada por uma adesão reduzida de neutrófilos às células endoteliais e quimiotaxia (CHEN et al., 2014).

Os resultados de Tang et al. (2008) demonstraram que o monometil fumarato (metabólito do dimetil fumarato) se liga ao mesmo local em HCAR2 que o ácido nicotínico (niacina). Isso é consistente com a ideia de que o bolso de ligação para HCAR2 requer ligantes de ácido carboxílico de baixo peso molecular (OFFERMANN, 2006). Tunaru et al. (2005) identificou Arg111, Ser178, Phe276 e Tyr284 como resíduos de aminoácidos críticos para a ligação do ácido nicotínico, mesma região onde o MMF se liga.

Nossos resultados mostraram que o MMF apresentou *docking score* e interações semelhantes ao ácido nicotínico, assim, sugere-se que ligação ao HCAR2 seja uma possível via pela qual o MMF exerce seus efeitos anti-inflamatório e antidepressivo. Apesar do melhor *score* de *docking* do ácido nicotínico, comparando o EL do MMF com o ácido nicotínico (TABELA 5), pode-se inferir que o MMF é mais eficiente na ligação ao HCAR2 do que o ácido nicotínico.

Segundo Parodi et al. (2015), a ativação do HCAR2 com a ligação ao MMF levaria à ativação da cascata de sinalização da proteína G-tipo Gi, levando à ativação da fosfolipase C (BLAD et al., 2011) e, assim, em aumento de $[Ca^{2+}]_i$. O aumento em $[Ca^{2+}]_i$ levaria, através da fosforilação da treonina 172 pela proteína dependente de cálcio / calmodulina cinase 2, à ativação da Proteína Cinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK) (HURLEY et al., 2005). Esta, por sua vez, ativaria a proteína Sirtuína-1 (SIRT1),

através da conversão de NAM a NAD⁺ pela enzima nicotinamida bosiiltransferase (NAMPT), a enzima limitadora de velocidade na via de biossíntese do NAD (FULCO et al., 2008).

A proteína SIRT1 é um membro das Sirtuínas, uma família de proteínas desacetilases dependentes de NAD⁺ que regula um grande número de processos celulares, incluindo envelhecimento, metabolismo, homeostase redox, sobrevivência celular e inflamação. SIRT1 desacetila vários genes alvo, incluindo proteínas histonas, p53, NF-κB e regula suas atividades (SINGH et al., 2018).

Esta é amplamente expressa no SNC, envolvida na manutenção das funções cerebrais fisiológicas e exibe efeitos neuroprotetores e antiinflamatórios em muitas doenças neurodegenerativas. Vários estudos têm mostrado que a desregulação da SIRT1 contribui para a patogênese do TDM (ALAGEEL et al., 2018; LU et al., 2018). A inibição farmacológica e genética de SIRT1 hipocampal leva a um comportamento semelhante à depressão em camundongos (ABE-HIGUCHI et al., 2016).

Foi demonstrado que a SIRT1 suprime NF-κB por desacetilação direta na lisina 310 de NF-κB p65 (YEUNG et al., 2004). Esta supressão do NF-κB leva à inibição da secreção de citocinas próinflamatórias e à troca do fenótipo classicamente ativado da microglia, pró-inflamatório, para um fenótipo potencialmente neuroprotetor alternativo (PARODI et al., 2015).

Sabe-se que em condições de estresse nitro-oxidativo, a transcrição e a atividade de ambas as isoformas de NQO1, enzima regulada por Nrf2, são aumentadas (TAKAHASHI et al., 1995). Seu aumento contribui para a restauração da homeostase redox ao aumentar os níveis de NAD⁺ e ativação de SIRT1s, FOXO e PGC-1α, que, por sua vez, conspiram para aumentar a atividade de Nrf2 (KIM et al., 2016).

Jiang et al. (2010) relataram que os efeitos inibitórios de Nrf2 na via de sinalização pró-fibrogênica em camundongos diabéticos induzidos por STZ estão associados à ativação de SIRT1. Da mesma forma, Yu; Huang e Chou (2020) demonstraram que ao utilizar um inibidor da SIRT1, os efeitos do fármaco-teste (oligofuoidano) na ativação de Nrf2, foram inibidos, demonstrando que há um crosstalk entre a cascata SIRT1 e Nrf2.

Shah et al. (2017) mostraram que a melatonina exerce atividades antioxidantes e antiinflamatórias por meio da ativação, dependente de SIRT1, do fator de transcrição Nrf2 no cérebro de ratos imaturos e em células BV2. Quando foi utilizado um inibidor da SIRT1, as expressões de SIRT1 e Nrf2 foram significativamente diminuídas, sugerindo que a inibição de Nrf2 induzida por LPS é dependente de SIRT1 *in vitro* e *in vivo*. Da mesma forma, esses resultados mostraram que, como resultado da inibição de SIRT1, a expressão de proteínas pró-

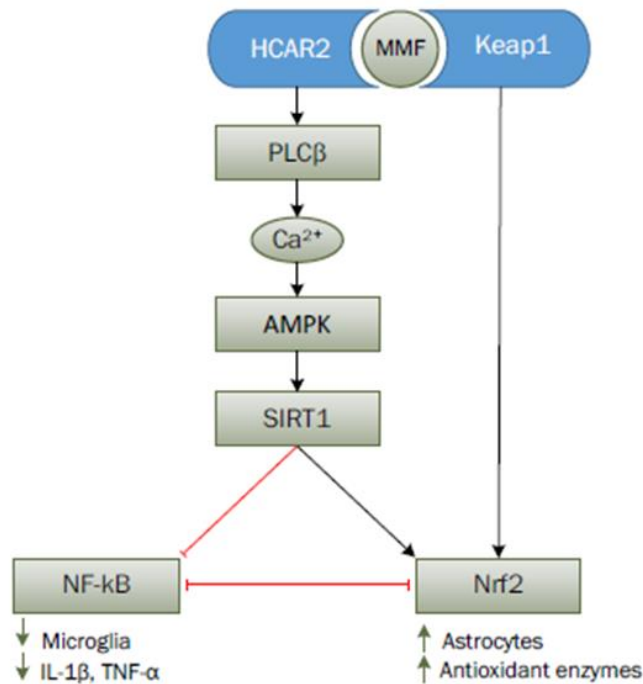
inflamatórias, como NF- κ B e COX-2, aumentou ainda mais, sugerindo que SIRT1 desempenha um papel significativo na neuroinflamação induzida por LPS.

Outros estudos também mostraram que melatonina, através da ligação aos seus receptores, que são acoplados à proteína G (REITER et al., 2018; SONG et al., 2017; ZHOU et al., 2019), parece mediar a ativação da SIRT mitocondrial, levando ao aumento da atividade do eixo PGC-1 α -AMPK-SIRT (SONG et al., 2017; ZHAI et al., 2017).

Foi verificado que há um cross-talk transcricional mediado por redox entre as respostas Nrf2 e NF- κ B a LPS (ZHANG et al., 2017). Haghani et al. (2020) hipotetizaram o envolvimento de Keap1, que pode mediar a degradação de IKK β e inibir a localização nuclear de NF- κ B (KIM et al., 2010). Outras hipóteses são que o Nrf2 pode inibir o NF- κ B por meio da redução de espécies reativas (CUADRADO et al., 2014) e que o NF- κ B, por sua vez, também pode inibir a atividade do Nrf2 através do aumento do recrutamento da histona desacetilase para a região ARE (WAKABAYASHI et al., 2010).

Dessa forma, percebe-se que a ligação do monometil fumarato ao HCAR2 leva a uma cascata de sinalização, que culmina em alterações astrocíticas e microgliais e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, resultados demonstrados no presente trabalho (FIGURA 19).

Figura 19 - Cascata de sinalização HCAR2/SIRT1/Nrf2



Via de sinalização de HCAR2 / SIRT1 / Nrf2: a ativação de HCAR2 após a ligação de MMF levaria à ativação da fosfolipase C e, portanto, ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$, que levaria à ativação de AMPK. Isso, por sua vez, ativaria a proteína SIRT1, que demonstrou suprimir o NF- κ B. Essa supressão do NF- κ B leva à redução da expressão da microglia e de citocinas pró-inflamatórias. Há um crosstalk entre a cascata SIRT1 e Nrf2, sendo a ativação do Nrf2 dependente de SIRT1. A interação do MMF com a proteína Keap1 pode levar à ativação direta do Nrf2, que, por sua vez, leva ao aumento da expressão de astrócitos e enzimas antioxidantes. Além disso, o Nrf2 pode inibir o NF- κ B e o NF- κ B, por sua vez, também pode inibir a atividade do Nrf2.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho revelaram que o dimetil fumarato é um pró fármaco promissor para o tratamento do TDM e de comorbidades como o déficit de memória, apresentando inclusive alguns resultados superiores ao antidepressivo fluoxetina.

O DMF modulou a via neuroinflamatória, aumentando a expressão astrocitária, reduzindo a ativação microglial e a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α . Os resultados computacionais sugerem as proteínas Keap1 e HCAR2 como prováveis alvos do monometil fumarato (metabólito ativo do DMF), já que o MMF realizou interações importantes com a proteína Keap1, o que possibilitaria ativação do Nrf2, assim como com a proteína HCAR2, podendo levar a uma complexa cascata de sinalização, que possui um *crosstalk* com a via Nrf2.

Dessa forma, sugere-se que um dos mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo do DMF é a supressão neuroinflamatória, através da via de sinalização HCAR2/ Nrf2. No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de melhor compreender os mecanismos moleculares deste fármaco.

REFERÊNCIAS

- ABAD-ZAPATERO, C. Ligand efficiency indices for effective drug Discovery e Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. 4, p. 469–488, 2007.
- ABD EL-FATTAH, A. A. et al. Resveratrol and dimethyl fumarate ameliorate depression-like behaviour in a rat model of chronic unpredictable mild stress. **Brain Research**, v. 15, n. 1701, p. 227–236, 2018.
- ABE-HIGUCHI, N. et al. Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 11, p. 815–826, 2016.
- ADZIC, M. et al. Therapeutic Strategies for Treatment of Inflammation-related Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 2, 2017.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–653, 2004.
- ALAGEEL, A. et al. Evidence supporting a mechanistic role of sirtuins in mood and metabolic disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, p. 95–101, 2018.
- ALBRECHT, P. et al. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, 2012.
- ALI, S. S. et al. The antidepressant-like effect of *Ocimum basilicum* in an animal model of depression. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 6, p. 390–401, 2017.
- ALI, T. et al. Acute dose of melatonin via Nrf2 dependently prevents acute ethanol-induced neurotoxicity in the developing rodent brain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, 2018.
- AL-JADERI, Z.; MAGHAZACHI, A. A. Utilization of dimethyl fumarate and related molecules for treatment of multiple sclerosis, cancer, and other diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.
- AMATO, M. P. et al. Effects of 2-year treatment with dimethyl fumarate on cognition and functional impairment in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. **Neurological Sciences**, v. 41, n. 11, p. 3185–3193, 2020.
- ANDREWS, P. W. et al. Blue again: Perturbational effects of antidepressants suggest monoaminergic homeostasis in major depression. **Frontiers in Psychology**, v. 159, n. 2, 2011.
- ARAYA-CALLÍS, C. et al. Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus. **Psychopharmacology**, v. 224, n. 1, p. 209–222, 2012.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–35, maio 1973.

AUDET, M. C.; GOULET, S.; DORÉ, F. Y. Repeated subchronic exposure to phencyclidine elicits excessive atypical grooming in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 167, n. 1, p. 103–110, 2006.

BACHILLER, S. et al. Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. 488, 2018.

BANASR, M. et al. Glial pathology in an animal model of depression: Reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 501–511, 2010.

BARROS, M. B. A. et al. Report on sadness/depression, nervousness/anxiety and sleep problems in the Brazilian adult population during the COVID-19 pandemic. *Epidemiol Serv Saude*. v. 29, n. 4, e2020427, 2020.

BATEMAN, A. et al. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. D480–D489, 2021.

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

BLAD, C. C. et al. Biological and Pharmacological Roles of HCA Receptors. **Advances in Pharmacology**, v. 62, p. 219–250, 2011.

BONDY, B.; ZILL, P. Pharmacogenetics and psychopharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 72–78, 2004.

BOUTTEN, A. et al. NRF2 targeting: A promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 363–371, 2011.

BROOKS, A. K. et al. Desipramine decreases expression of human and murine indoleamine-2,3-dioxygenases. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 62, p. 219–229, 2017.

BUSSE, M. et al. Decreased quinolinic acid in the hippocampus of depressive patients: evidence for local anti-inflammatory and neuroprotective responses? **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 265, n. 4, p. 321–329, jun. 2015.

CZECH, M.; GRESSENS, P.; KAINDL, A. M. The yin and yang of microglia. **Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 199–209, 2011.

CALKINS, M. J. et al. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 3, p. 497–508, 2009.

CAMPOLO, M. et al. The Neuroprotective Effect of Dimethyl Fumarate in an MPTP-Mouse Model of Parkinson's Disease: Involvement of Reactive Oxygen Species/Nuclear Factor- κ B/Nuclear Transcription Factor Related to NF-E2. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 27, n. 8, p. 453–471, 2017.

- CANNING, P.; SORRELL, F. J.; BULLOCK, A. N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, n. Part B, p. 101–107, 2015.
- CARROLL, B. J. et al. Pathophysiology of hypercortisolism in depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 433, n. 115, p. 90–103, 2007.
- CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 225, 2004.
- CHEN, C. et al. Contribution of neural cell death to depressive phenotypes of streptozotocin-induced diabetic mice. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 7, n. 6, p. 723–730, 2014.
- CHEN, P. C. et al. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 8, p. 2933–2938, 2009.
- CHEN, J.; ZHANG, Z.; CAI, L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. **Diabetes Metab J**. v. 38, n. 5, p. 337-45, 2014.
- CHOUDARY, P. V. et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15653–15658, 2005.
- CINTRA, D. E. et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- CIPRIANI, A.; BARBUI, C.; GEDDES, J. R. Suicide, depression, and antidepressants. **British Medical Journal**, v. 330, n. 7488, p. 373–374, 2005.
- CLEASBY, A. et al. Structure of the BTB domain of Keap1 and its interaction with the triterpenoid antagonist CDDO. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- CUADRADO, A. et al. Transcription factors NRF2 and NF- κ B are coordinated effectors of the rho family, GTP-binding protein RAC1 during Inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 22, p. 15244–15258, 2014.
- CUADRADO, A. et al. Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: A systems medicine approach. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 348–383, 2018.
- CZÉH, B. et al. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1616–1626, 2006.
- DA COSTA, R. M. et al. Nrf2 as a potential mediator of cardiovascular risk in metabolic diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.
- DANTZER, R. et al. Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 426–436, 2011.

- DARCET, F. et al. Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 136–148, 2014.
- DAVID, J. A. et al. The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, 2017.
- DAVIES, T. G. et al. Monoacidic Inhibitors of the Kelch-like ECH-Associated Protein 1: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (KEAP1:NRF2) Protein-Protein Interaction with High Cell Potency Identified by Fragment-Based Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3991–4006, 2016.
- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002.
- DE OLIVEIRA, W. H. et al. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. **Brain Research**, v. 1644, p. 149–160, 2016.
- DING, L. et al. Protective effects of phosphodiesterase 2 inhibitor on depression-and anxiety-like behaviors: Involvement of antioxidant and anti-apoptotic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 268, p. 150–158, 2014.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; ABRAMOV, A. Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, n. Part B, p. 179–188, 2015.
- DOWLATI, Y. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 2010.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, nov. 1988.
- EROGLU, C.; BARRES, B. A. Regulation of synaptic connectivity by glia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 223–231, 2010.
- FAJEMIROYE, J. O. et al. Oleanolic acid acrylate elicits antidepressant-like effect mediated by 5-HT 1A receptor. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- FAN, C. et al. Neuroprotective Effects of Ginsenoside-Rg1 Against Depression-Like Behaviors via Suppressing Glial Activation, Synaptic Deficits, and Neuronal Apoptosis in Rats. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2889–2907, 2018.
- FARHAN, M. et al. Unpredictable chronic mild stress induced behavioral deficits: A comparative study in male and female rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 879–884, 2014.
- FARIA, R. et al. Alterations in phospholipidomic profile in the brain of mouse model of depression induced by chronic unpredictable stress. **Neuroscience**, v. 273, p. 1–11, 2014.
- FAROOQ, R. K. et al. Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 130–137, 2012.

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, 2006.

FU, S. P. et al. β -hydroxybutyric acid inhibits growth hormone-releasing hormone synthesis and secretion through the GPR109A/extracellular signal-regulated 1/2 signalling pathway in the hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, n. 3, p. 212–222, 2015.

FU, Y. et al. Fluvoxamine increased glutamate release by activating both 5-HT₃ and sigma-1 receptors in prelimbic cortex of chronic restraint stress C57BL/6 mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 4, p. 826–837, 2012.

FULCO, M. et al. Glucose Restriction Inhibits Skeletal Myoblast Differentiation by Activating SIRT1 through AMPK-Mediated Regulation of Nampt. **Developmental Cell**, v. 14, n. 5, p. 661–673, 2008.

FURUTA, A. et al. Expression of glutamate transporter subtypes during normal human corticogenesis and type II lissencephaly. **Developmental Brain Research**, v. 155, n. 2, p. 155–164, 2005.

GAŁECKI, P.; TALAROWSKA, M. Inflammatory theory of depression. **Psychiatria Polska**, v. 52, n. 3, p. 437–447, 2018.

GARCÍA-ROMAN, R. et al. The differential NF- κ B modulation by S-adenosyl-L-methionine, N-acetylcysteine and quercetin on the promotion stage of chemical hepatocarcinogenesis. **Free Radical Research**, v. 42, n. 4, p. 331–343, 2008.

GARZA, J. C. et al. Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3 β / β -catenin signaling. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 8, p. 790–808, jul. 2012.

GAYNES, B. N. et al. What did STAR*D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. **Psychiatric Services**, v. 60, n. 11, p. 1439–1445, 2009.

GFELLER, D.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. **Bioinformatics**, v. 29, n. 23, p. 3073–3079, 2013.

GOLD, R. et al. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 12, p. 1098–1107, 2012.

GUADAGNO, J. et al. Microglia-derived TNF α induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 3, p. e538–e547, 2013.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. 5HT₃ receptor antagonist (ondansetron) reverses depressive behavior evoked by chronic unpredictable stress in mice: Modulation of hypothalamic–pituitary–adrenocortical and brain serotonergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 129–136, 2014.

- HAAPAKOSKI, R. et al. Innate and adaptive immunity in the development of depression: An update on current knowledge and technological advances. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 66, p. 63–72, 2016.
- HAGHANI, A. et al. Mouse brain transcriptome responses to inhaled nanoparticulate matter differed by sex and APOE in Nrf2-Nfkb interactions. **eLife**, v. 9, p. 1–20, 2020.
- HAMER, H. M. et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104–119, 2008.
- HANNESTAD, J.; DELLAGIOIA, N.; BLOCH, M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: A meta-analysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 12, p. 2452–2459, 2011.
- HARVEY, C. J. et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 4, p. 443–453, 2009.
- HE, Z.-Y. et al. Gamma-H2AX upregulation caused by Wip1 deficiency increases depression-related cellular senescence in hippocampus. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.
- HEO, L. et al. GalaxySite: Ligand-binding-site prediction by using molecular docking. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 210–214, 2014.
- HEWETT, J. A. Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 6, p. 1717–1736, 2009.
- HINWOOD, M. et al. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 22, n. 6, p. 1442–1454, 2012.
- HO, N.; SOMMERS, M. S.; LUCKI, I. Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: Links to cognition and depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1346–1362, 2013.
- HU, L. et al. Melatonin decreases M1 polarization via attenuating mitochondrial oxidative damage depending on UCP2 pathway in prorenin-treated microglia. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212138, 2019.
- HUERTA, C. et al. Characterization of novel small-molecule NRF2 activators: Structural and biochemical validation of stereospecific KEAP1 binding. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 11, p. 2537–2552, 2016.
- HURLEY, R. L. et al. The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 32, p. 29060–29066, 2005.
- IADECOLA, C.; ANRATHER, J. Stroke research at a crossroad: Asking the brain for directions. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1363–1368, 2011.

IBI, D.; SUZUKI, F.; HIRAMATSU, M. Effect of AceK (acesulfame potassium) on brain function under dietary restriction in mice. **Physiology and Behavior**, v. 188, p. 291–297, 2018.

INIAGHE, L. O. et al. Dimethyl fumarate confers neuroprotection by casein kinase 2 phosphorylation of Nrf2 in murine intracerebral hemorrhage. **Neurobiology of Disease**, v. 82, p. 349–358, 2015.

INSEL, T. R.; SAHAKIAN, B. J. A plan for mental illness. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 269, 2012.

INSERRA, A. et al. Neuroimmunomodulation in Major Depressive Disorder: Focus on Caspase 1, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Interferon-Gamma. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 6, p. 4288–4305, 2019.

ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Molecular Brain Research**, v. 57, n. 1, p. 1–9, 1998.

JIANG, T. et al. The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 850–860, 2010.

JING, X. et al. Dimethyl fumarate attenuates 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and in animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity. **Neuroscience**, v. 286, p. 131–140, 2015.

JNOFF, E. et al. Binding mode and structure-activity relationships around direct inhibitors of the Nrf2-Keap1 complex. **ChemMedChem**, v. 9, n. 4, p. 699–705, 2014.

JOHNSON, D. A. et al. The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Toxicological Sciences**, v. 114, n. 2, p. 237–246, 2010.

KANAZAWA, H. et al. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C- γ -dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 20026–20032, 2002.

KAPPOS, L. et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. **The Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1463–1472, 2008.

KAUPPINEN, A. et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 10, p. 1939–1948, 2013.

KELLER, K. S.; NEALE, M. C.; KENDLER, K.S., K. S. Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. **American Journal of Psychiatry**, v. 165, n. 3, p. 1521–1529, 2007.

KEISER, M.J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nat Biotech**, v. 25, n.2, p. 197–206, 2007.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 89–116, 2007.

KESERÜ, G. M.; MAKARA, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 3, p. 203–212, mar. 2009.

KHAN, A. et al. A systematic review of comparative efficacy of treatments and controls for depression. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

KIM, H. K. et al. Cytotoxicity of lipid-soluble ginseng extracts is attenuated by plasma membrane redox enzyme NQO1 through maintaining redox homeostasis and delaying apoptosis in human neuroblastoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 10, p. 1339–1348, 2016.

KIM, J. E. et al. Suppression of NF- κ B signaling by KEAP1 regulation of IKK β activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 11, p. 1645–1654, 2010.

KIMELBERG, H. K. Functions of mature mammalian astrocytes: A current view. **Neuroscientist**, v. 16, n. 1, p. 79–106, 2010.

KIYOHARA, C.; YOSHIMASU, K. Molecular epidemiology of major depressive disorder. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 14, n. 2, p. 71–87, 2009.

KORTAM, M. A.; ALI, B. M.; FATHY, N. The deleterious effect of stress-induced depression on rat liver: Protective role of resveratrol and dimethyl fumarate via inhibiting the MAPK/ERK/JNK pathway. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 1, 2021.

KRAFT, A. D.; JOHNSON, D. A.; JOHNSON, J. A. Nuclear Factor E2-Related Factor 2-Dependent Antioxidant Response Element Activation by tert-Butylhydroquinone and Sulforaphane Occurring Preferentially in Astrocytes Conditions Neurons against Oxidative Insult. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 5, p. 1101–1112, 2004.

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

KUMAR, V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. v. 332, p. 16–30, 2019.

LAHTINEN, H. et al. Post-insult activity is a major cause of delayed neuronal death in organotypic hippocampal slices exposed to glutamate. **Neuroscience** v. 105, p. 131–137, 2001.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 91–104, 2002.

LEVENTOPOULOS, M. et al. Long-term effects of early life deprivation on brain glia in

Fischer rats. **Brain Research**, v. 1142, n. 1, p. 119–126, 2007.

LEWERENZ, J. et al. The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in health and disease: From molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 5, p. 522–555, 2013.

LI, X. Y. et al. Helicid ameliorates learning and cognitive ability and activities cAMP/PKA/CREB signaling in chronic unpredictable mild stress rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 7, p. 1146–1154, 2019.

LICINIO, J.; WONG, M. L. Depression, antidepressants and suicidality: A critical appraisal. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 165–171, 2005.

LINKER, R. A. et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**, v. 134, n. 3, p. 678–692, 2011.

LINKER, R. A.; GOLD, R. Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: Mechanism of action, effectiveness, and side effects. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 11, p. 394, 2013.

LIU, L. et al. Anti-depressive effectiveness of baicalin in vitro and in vivo. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 1–13, 2019a.

LIU, L. et al. Pretreatment with Korean red ginseng or dimethyl fumarate attenuates reactive gliosis and confers sustained neuroprotection against cerebral hypoxic-ischemic damage by an Nrf2-dependent mechanism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 131, p. 98–114, 2019b.

LIU, Q. et al. Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 11, p. 796–805, 2009.

LIVELY, S.; SCHLICHTER, L. C. Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 1–19, 2018.

LOEWE, R. et al. Dimethylfumarate Inhibits TNF-Induced Nuclear Entry of NF- κ B/p65 in Human Endothelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4781–4787, 2002.

LU, G. et al. Role and possible mechanisms of sirt1 in depression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

LU, X.-Y. et al. Leptin: A potential novel antidepressant. v. 103, n. 5, p. 1593–1598, 2006.

LU, T. et al. Role of Nrf2 signaling in the regulation of vascular BK channel β 1 subunit expression and BK channel function in high-fat diet-induced diabetic mice. **Diabetes**, v. 66, n. 10, p. 2681–2690, 2017.

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,

2011.

MAGESH, S.; CHEN, Y.; HU, L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 4, p. 687–726, 2012.

MANTOVANI, M. et al. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neuroscience Letters**, v. 343, n. 1, p. 1–4, 2003.

MARCOTTE, D. et al. Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 14, p. 4011–4019, 2013.

MCMAHON, M. et al. Dimerization of substrate adaptors can facilitate Cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism: A two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24756–24768, 2006.

MCQUEEN, G. et al. Effects of N-acetylcysteine on brain glutamate levels and resting perfusion in schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 10, p. 3045–3054, 2018.

MEHTA, V.; PARASHAR, A.; UDAYABANU, M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. **Physiology & Behavior**, v. 171, p. 69–78, 2017.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, 2011.

MIGUEL-HIDALGO, J. J. et al. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 861–873, 2000.

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, 2016.

MORIGUCHI, S. et al. Glutamatergic neurometabolite levels in major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of proton magnetic resonance spectroscopy studies. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 7, p. 952–964, 2019.

MULLER, M. B. et al. Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 1603–1612, 2001.

NAIR, S. et al. Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 12, p. 2070–2082, 2008.

NORMANDEAU, C. P. et al. A Key Role for Neurotensin in Chronic-Stress-Induced Anxiety-Like Behavior in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 2, p. 285–293, 2018.

- NG, F. et al. Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 6, p. 851–876, 2008.
- NUTT, D. J. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 69 Suppl E, p. 4–7, 2008.
- OCKENFELS, H. M. et al. The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokines of the psoriatic cytokine network. **British Journal of Dermatology**, v. 139, n. 3, p. 390–395, 1998.
- OFFERMANN, S. The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 7, p. 384–390, 2006.
- OFFERMANN, S. et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXXII: Nomenclature and classification of hydroxy-carboxylic acid receptors (GPR81, GPR109A, and GPR109B). **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 269–290, 2011.
- OFFERMANN, S.; SCHWANINGER, M. Nutritional or pharmacological activation of HCA2 ameliorates neuroinflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 245–255, 2015.
- OH, D. H. et al. Neuropathological abnormalities of astrocytes, GABAergic neurons, and pyramidal neurons in the dorsolateral prefrontal cortices of patients with major depressive disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 330–338, 2012.
- OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16065, 2016.
- PALLESEN, J. S.; TRAN, K. T.; BACH, A. Non-covalent Small-Molecule Kelch-like ECH-Associated Protein 1-Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Keap1-Nrf2) Inhibitors and Their Potential for Targeting Central Nervous System Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 8088–8103, 2018.
- PAPALEO, F. et al. Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. **Learning and Memory**, v. 18, n. 8, p. 534–544, 2011.
- PARODI, B. et al. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 2, p. 279–295, 2015.
- PATEL, B.; MANN, G. E.; CHAPPLE, S. J. Concerted redox modulation by sulforaphane alleviates diabetes and cardiometabolic syndrome. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, p. 150–160, 2018.
- PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2. ed. San Diego, CA, USA.: Academic Press., 2001.

- PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 421–431, 2009.
- PERMPOONPUTTANA, K. et al. Long-term administration of melatonin attenuates neuroinflammation in the aged mouse brain. **EXCLI Journal**, v. 17, p. 634–646, 2018.
- PITT, D. et al. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 61, n. 8, p. 1113–1120, 2003.
- PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88–109, 2008.
- PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–2, 21 abr. 1977.
- PRENDERGAST, M. A. et al. In vitro effects of ethanol withdrawal and spermidine on viability of hippocampus from male and female rat. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v. 24, p. 1855–1861, 2000.
- QUAN, W. et al. Antidepressant-like effects of magnesium lithospermate B in a rat model of chronic unpredictable stress. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 8, p. 1168–1175, 2015.
- RAJKOWSKA, G. et al. Prominent reduction in pyramidal neurons density in the orbitofrontal cortex of elderly depressed patients. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 4, p. 297–306, 2005.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 6 ed. São Paulo: Elsevier, 2007.
- RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 119–145, 2009.
- RAWDIN, B. J. et al. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 143–152, 2013.
- REITER, R. J. et al. Melatonin mitigates mitochondrial meltdown: Interactions with SIRT3. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p.2439, 2018.
- REZQ, S.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Central GPR109A activation mediates glutamate-dependent pressor response in conscious rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 2, p. 456–465, 2016.
- RINWA, P.; KUMAR, A. Piperine potentiates the protective effects of curcumin against chronic unpredictable stress-induced cognitive impairment and oxidative damage in mice. **Brain Research**, v. 1488, p. 38–50, 2012.
- RUSH, A. J. et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: A STAR*D report. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 11, p. 1905–1917, 2006.
- SALENTIN, S. et al. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids**

Research, v. 43, n. W1, p. W443–W447, 2015.

SANACORA, G. et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 426–437, 2008.

SANDOR, N. T. et al. Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat striatum. **Brain Research Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 483–486, 1995.

SAPOLSHY, R. M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **The Science of Mental Health: Stress and the Brain**, v. 9, p. 125–136, 2013.

SCHIEPERS, O. J. G.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201–217, 2005.

SCHULZE-TOPPHOFF, U. et al. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 17, p. 4777–4782, 2016.

SHAH, S. A. et al. Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 33–44, 2017.

SHARMA, H. R.; THAKUR, M. K. Correlation of ER α /ER β expression with dendritic and behavioural changes in CUMS mice. **Physiology and Behavior**, v. 145, p. 71–83, 2015.

SHEHU, A. et al. Methanol stem bark extract of *Adansonia digitata* ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior: Involvement of the HPA axis, BDNF, and stress biomarkers pathways. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 3, 2019.

SHMELKOV, S. V. et al. Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. **Nature Medicine**, v. 16, n. 5, p. 598–602, 2010.

SILVA-ISLAS, C. A.; MALDONADO, P. D. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 92–99, ago. 2018.

SINGH, C. K. et al. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 28, n. 8, p. 643–661, 2018.

SINGH, N. et al. Effect of dimethyl fumarate on neuroinflammation and apoptosis in pentylenetetrazol kindling model in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 144, p. 233–245, 2019.

SINGHAKUMAR, R. et al. Melatonin attenuates methamphetamine-induced inhibition of neurogenesis in the adult mouse hippocampus: An in vivo study. **Neuroscience Letters**, v. 606, p. 209–214, 2015.

SINGHAL, G.; BAUNE, B. T. Microglia: An interface between the loss of neuroplasticity and depression. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 2017.

SNOW, W. M.; ALBENSI, B. C. Neuronal gene targets of NF- κ B and their dysregulation in alzheimer's disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, n. 118, 2016.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

SONG, C. et al. Imbalance between Pro- and Anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: The effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. **Pharmacopsychiatry**, v. 42, n. 5, p. 182–188, 2009.

SONG, C. et al. Melatonin-mediated upregulation of Sirt3 attenuates sodium fluoride-induced hepatotoxicity by activating the MT1-PI3K/AKT-PGC-1 α signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 112, p. 616–630, 2017.

STAHL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology**. 3 ed. Nova York: Cambridge University Press, 2008.

STEFANSON, A. L.; BAKOVIC, M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: Focus on plant-derived compounds and trace minerals. **Nutrients**, v. 6, n. 9, p. 3777–3801, 2014.

SULLIVAN, S. M. et al. Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: An identified role for GFAP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 40, p. 29414–29423, 2007.

TAGGART, A. K. P. et al. (D)- β -hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 29, p. 26649–26652, 2005.

TAKAHASHI, T. et al. Reduction of ubiquinone in membrane lipids by rat liver cytosol and its involvement in the cellular defence system against lipid peroxidation. **Biochemical Journal**, v. 309, n. 3, p. 883–890, 1995.

TANG, H. et al. The psoriasis drug monomethylfumarate is a potent nicotinic acid receptor agonist. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 375, n. 4, p. 562–565, 2008.

TONG, K. I. et al. Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 8, p. 2887–2900, 2006.

TRONEL, C. et al. Molecular targets for PET imaging of activated microglia: The current situation and future expectations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 2017.

TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **Eur J Neurosci.**, v. 53, n. 1, p. 151–171, 2021.

TUNARU, S. et al. Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). **Molecular Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 1271–1280, 2005.

UGOLINI, F. et al. Different Patterns of Neurodegeneration and Glia Activation in CA1 and CA3 Hippocampal Regions of TgCRND8 Mice. **Frontiers in aging neuroscience** v. 10 p. 372, 2018.

UHER, R. et al. An inflammatory biomarker as a differential predictor of outcome of depression treatment with escitalopram and nortriptyline. **American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 12, p. 1278–1286, 2014.

UNNI, S. et al. Structural insights into the multiple binding modes of Dimethyl Fumarate (DMF) and its analogs to the Kelch domain of Keap1. **FEBS J.** v. 288, n. 5, p. 1599-1613, 2021.

VAN BOXELAERE, M. et al. Unpredictable chronic mild stress differentially impairs social and contextual discrimination learning in two inbred mouse strains. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188537, 2017

VASCONCELOS, A. R. et al. Nrf2/ARE pathway modulation by dietary energy regulation in neurological disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 33, 2019.

VENKATESH, G. M.; SANKAR, V.; RAMATHAN. Molecular mechanism of tuberoinfundibular peptide of 39 on glucocorticoid receptor mediated glutamate/GABA imbalance and cerebral abnormalities against cognitive deficit model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 6, p. 996–1006, 2019.

VERHOOF, E. et al. Health-related quality of life, anxiety and depression in young adults with disability benefits due to childhood-onset somatic conditions. **Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health**, v. 7, n. 1, 2013.

WAKABAYASHI, N. et al. When NRF2 talks, who's listening? **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 13, n. 11, p. 1649–1663, 2010.

WALKER, F.; NILSSON, M.; JONES, K. Acute and Chronic Stress-Induced Disturbances of Microglial Plasticity, Phenotype and Function. **Current Drug Targets**, v. 14, n. 11, p. 1262–1276, 2013.

WANG, H. et al. Involvement of chronic unpredictable mild stress-induced hippocampal LRP1 up-regulation in microtubule instability and depressive-like behavior in a depressive-like adult male rat model. **Physiology and Behavior**, v. 215, 2020.

WANG, J. M. et al. BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress. **Physiology and Behavior**, v. 151, p. 360–368, 2015.

WANG, L. L. et al. N-acetylcysteine Ameliorates Prostatitis via miR-141 Regulating Keap1/Nrf2 Signaling. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 938–947, 2016.

WHITEHEAD, N. P. et al. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 7, p. 2003–2014, 2008.

WILLARD, S. L. et al. Cell number and neuropil alterations in subregions of the anterior

hippocampus in a female monkey model of depression. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 12, p. 890–897, 2013.

WILLIAMS, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293–315, 2018.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–64, 1987.

WILLNER, P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 68–77, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Depression**. Geneva, 2020. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/> Acesso em: 18 janeiro 2021.

WU, G. et al. Britanin Ameliorates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Inducing the Nrf2 Protective Pathway. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 27, n. 11, p. 754–768, out. 2017.

XU, Z. et al. Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2015.

XU, L.-Y. et al. Relationship between cerebellar structure and emotional memory in depression. **Brain and Behavior**, v. 7, n. 7, p. e00738, 2017.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W174–W181, 2015.

YEUNG, F. et al. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. **EMBO Journal**, v. 23, n. 12, p. 2369–2380, 2004.

YOUNG, J. J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, p. 15–20, 2014.

YU, W. C.; HUANG, R. Y.; CHOU, T. C. Oligo-fucoidan improves diabetes-induced renal fibrosis via activation of sirt-1, glp-1r, and nrf2/ho-1: An in vitro and in vivo study. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 1–15, 2020.

YUAN, J. et al. M2 microglia promotes neurogenesis and oligodendrogenesis from neural stem/progenitor cells via the PPAR γ signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 19855–19865, 21 mar. 2017.

ZANDI-NEJAD, K. et al. The role of HCA2 (GPR109A) in regulating macrophage function. **FASEB Journal**, v. 27, n. 11, p. 4366–4374, 2013.

ZHAI, M. et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 63, n. 2, 2017.

ZHANG, C. et al. Minocycline ameliorates depressive behaviors and neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 356, p. 348–357, 2019.

ZHANG, H. et al. Temporal changes in glutathione biosynthesis during the lipopolysaccharide-induced inflammatory response of THP-1 macrophages. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, p. 304–310, 2017.

ZHANG, M. et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 100, n. 1, p. 30–47, 2013.

ZHENG, M. et al. Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from *Apocynum venetum* leaves: Possible cellular mechanisms. **Phytomedicine**, v. 19, n. 2, p. 145–149, 2012.

ZHENG, Z. V.; WONG, K. C. G. Microglial activation and polarization after subarachnoid hemorrhage. **Neuroimmunology and Neuroinflammation**, v. 2019, 2019.

ZHOU, W. et al. Melatonin increases bone mass around the prostheses of OVX rats by ameliorating mitochondrial oxidative stress via the SIRT3/SOD2 signaling pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

ZHU, X. et al. Danzhi Xiaoyao San ameliorates depressive-like behavior by shifting toward serotonin via the downregulation of hippocampal indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 86–93, 2015.

ZOU, T. et al. Geniposide Alleviates Oxidative Stress of Mice With Depression-Like Behaviors by Upregulating Six3os1. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.