



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

IARDJA STÉFANE LOPES SALES

**RIPARINA I E RIPARINA II REDUZEM A NEUROINFLAMAÇÃO E AS
ALTERAÇÕES GLIAIS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
DEPRESSÃO INDUZIDA POR ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL**

FORTALEZA

2023

IARDJA STÉFANE LOPES SALES

RIPARINA I E RIPARINA II REDUZEM A NEUROINFLAMAÇÃO E AS ALTERAÇÕES
GLIAIS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO
INDUZIDA POR ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

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

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

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S155r Sales, Iardja Stéfane Lopes.
Riparina I e Riparina II reduzem a neuroinflamação e as alterações gliais em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível / Iardja Stéfane Lopes Sales. – 2023.
115 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
1. doenças neuroinflamatórias. 2. depressão. 3. astrócitos. 4. micróglia. 5. proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR. I. Título.

CDD 615.1

IARDJA STÉFANE LOPES SALES

RIPARINA I E RIPARINA II REDUZEM A NEUROINFLAMAÇÃO E AS ALTERAÇÕES
GLIAIS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO
INDUZIDA POR ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

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

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Raquell de Castro Chaves
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Álefe Brito Monteiro
Faculdade de Saúde de Paulista (FASUP)

A Deus,
a fonte de todo o conhecimento.
Ao meu esposo,
meu maior incentivador.

AGRADECIMENTOS

Ao Eterno Deus, por sua graça e bondade infinitas, que durante todos os anos de minha vida nunca falharam, apesar de mim. *Soli Deo Gloria*.

Ao meu esposo, Johnny, por sua companhia inestimável! Johnny é o maior presente que Deus já me deu nesta vida. Ele é meu porto seguro e meu maior incentivador. Sem ele, eu jamais teria conseguido concluir esse doutorado. Sua calma e paciência são virtudes que me ensinam todos os dias. Te amo, meu bem! Obrigada por me fazer viver os melhores anos da minha vida, e por ser raio de sol nas horas sombrias.

Aos meus pais, que sempre me encorajaram a estudar e a me empenhar em cada atividade desenvolvida. Eles nunca mediram esforços para prover o necessário para nossa família. Sem esse apoio, eu não teria sequer chegado à graduação. Hoje, concluo mais uma etapa, como tentativa de retribuir tudo o que fizeram por mim.

Ao vovô e à vovó (em memória), que me alegraram nos dias mais cinzas com suas histórias. As tardes que passava com eles eram alento em meio à turbulência dos dias corridos. Sempre que olhava para eles, era encorajada a fazer um pouco mais, orando para ter pelo menos metade daquele vigor.

Aos meus amigos mais chegados, Filipe e Larissa, por estarem presentes em todos os momentos importantes e me permitirem ver o cuidado de Deus por mim. A companhia de vocês torna mais leve até os momentos mais difíceis.

Às minhas tulipinhas, Elidia, Gabi, Laura, Raabe e Talita, que muito me suportaram e encorajaram nos últimos anos. De um desprezioso encontro semanal (ou bimestral, rs), surgiu uma profunda amizade. Amo vocês, meninas! Com vocês dividi muitas terças-feiras de lamento, mas também tive as melhores crises de riso.

Aos meus queridos amigos do Dr. Cristo, um grande presente que recebi na UFC, Yuri e Elias e suas novas famílias. Nossa amizade sempre foi um vislumbre da Graça. E já que vocês, a cada encontro, me perguntavam pela defesa, aqui está! (Risos)

A todos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia. À minha amiga Alana, que me acompanha desde a graduação e que foi a melhor companheira de experimentos que alguém poderia ter. Aos colegas pós-graduandos por todo o conhecimento compartilhado e pela ajuda em todas as etapas: Manu, Larice, Daniel e Tiago. Ao Adriano e à professora Daniele, Paloma

e Michelle Verde pela colaboração e auxílio na realização da imunofluorescência. Aos ICs, Dilailson e Layla, que auxiliaram nos testes comportamentais. Ao Igor Moreira e ao professor Tiago Sampaio por prontamente ajudarem na realização da parte computacional.

Aos veterinários e funcionários do Biotério, Gabi, Wesley, Augusto e Sr. Adauto, pelo cuidado dedicado aos animais e por me ensinar a manuseá-los corretamente.

A todos os professores, coordenadores e funcionários do PPGF, pelos ensinamentos, facilitações e colaborações. Vocês foram muito importantes para a minha formação! Sou muito orgulhosa por fazer parte de um programa Capes 7!

À minha orientadora, Profa Cléa, que me recebeu há 10 anos. Sem qualquer conhecimento ou maturidade, fui acolhida por alguém a quem muito admiro, não apenas pelo conhecimento e pela didática (que é incrível!), mas também pela generosidade, humildade e disposição a ensinar. Tudo que eu aprendi até hoje, como profissional, foi observando-a de perto. Sempre serei grata por todas as oportunidades abertas a mim. Seu encorajamento para que eu participasse não apenas da pesquisa, mas também da extensão e da docência me guiaram à escolha da bela profissão de professor. Muito obrigada por tudo, minha querida professora!

Aos professores Tiago Sampaio, Carla Thiciane, Pedro Filho e Jamile Magalhães por aceitarem o convite para participar da banca de qualificação e oferecem tantas preciosas sugestões, e aos professores Raquell Chaves, Gislei Frota, Álefe Brito e Tiago Sampaio pela disposição em participar da banca de defesa, mesmo no seu período de férias. Sou muito grata.

À Universidade Federal do Ceará que tem sido a minha segunda casa há 13 anos.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

Cf. 1 Coríntios 13

RESUMO

A neuroinflamação tem sido apontada como um dos fatores relacionados à fisiopatologia dos transtornos depressivos, e o hipocampo mostrou-se uma das principais áreas cerebrais afetadas. Embora existam diversos antidepressivos disponíveis para o tratamento da depressão, muitos pacientes não respondem à farmacoterapia convencional ou apresentam efeitos adversos variados. Riparina I [(O-Metil)-N-benzoil-tiramina] (RIP I) e Riparina II [(O-Metil)-N-2-hidroxi-benzoil-tiramina] (RIP II) são substâncias que apresentaram atividade antidepressiva em modelos animais de estresse agudo e crônico por administração repetida de corticosterona. Dessa forma, o presente trabalho se propôs a investigar o efeito de RIP I e RIP II na neuroinflamação, utilizando o modelo de depressão induzida pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI). Para isso, camundongos *Swiss* machos foram expostos a eventos estressores durante 28 dias e a partir do 15º dia receberam RIP I ou RIP II na dose de 50 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), preferência social (Interação Social) e 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 e dosadas as citocinas TNF- α e IL-1 β no hipocampo. Além disso, estratégias computacionais foram utilizadas para predição de alvos proteicos e cálculos de *docking* molecular. O ECI induziu comportamentos ansiogênico e depressivo-símiles, déficit cognitivo, níveis elevados de citocinas TNF- α e IL-1 β , hipoativação de astrócitos, vista pela expressão reduzida do marcador GFAP e hiperativação da micróglia, com expressão aumentada do marcador Iba-1, no hipocampo. Essas alterações foram revertidas pelo tratamento com RIP I ou RIP II, mostrando sua atividade tipo antidepressiva, ansiolítica e anti-neuroinflamatória. A predição de alvos e *docking* molecular sugeriram as proteínas NLRP3, ASC e P2X7 como prováveis alvos de RIP I e RIP II. Na predição farmacocinética, com análise das propriedades físico-químicas, RIP I e RIP II mostraram-se bons candidatos a fármacos, apresentando boa disponibilidade oral e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. RIP I e RIP II são prováveis inibidoras de isoformas das enzimas hepáticas CYP1A2 e CYP2D6, porém não se mostraram substratos para a glicoproteína P. Os resultados apresentados mostram o potencial antidepressivo de RIP I e RIP II, com efeitos benéficos sobre os comportamentos relativos a anedonia, interação social e desempenho cognitivo, frente à exposição a um estresse crônico.

Esta capacidade está relacionada à inibição de mecanismos inflamatórios, com destaque para a capacidade de reverter danos associados a alterações astrocíticas e microgliais. O mecanismo de ação proposto por meio de *docking* molecular parece estar relacionado à modulação da via P2X7-NLRP3-IL1 β , provavelmente nos domínios NATCH de NLRP3, CARD de ASC e P2X7, como corroborado pelas alterações visualizadas na atividade de células gliais e níveis hipocâmpais de citocinas. RIP I e RIP II se mostraram promissoras frente aos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento de depressão.

Palavras-chave: doenças neuroinflamatórias; depressão; astrócitos; micróglia; proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR.

ABSTRACT

RIPARIN I AND RIPARIN II REDUCE NEUROINFLAMMATION AND GLIAL CHANGES IN MICE SUBMITTED TO THE CHRONIC UNPREDICTABLE STRESS-INDUCED DEPRESSION MODEL

Neuroinflammation has been identified as one of the factors related to the pathophysiology of depressive disorders, and the hippocampus has been shown to be one of the main brain areas affected. Although there are several antidepressants available for the treatment of depression, many patients do not respond to conventional pharmacotherapy or experience various adverse effects. Riparin I [(O-Methyl)-N-benzoyl-tyramine] (RIP I) and Riparin II [(O-Methyl)-N-2-hydroxy-benzoyl-tyramine] (RIP II) are substances that showed antidepressant activity in animal models of acute and chronic stress by repeated administration of corticosterone. Thus, the present study aimed to investigate the effect of RIP I and RIP II on neuroinflammation, using the model of depression induced by Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS). For this, male Swiss mice were exposed to stressful events for 28 days and from the 15th day received RIP I or RIP II at a dose of 50 mg/kg or fluoxetine 10 mg/kg or vehicle, orally; one group did not undergo the ECI, in order to be used as a control. On the 29th day, the animals were submitted to behavioral tests to evaluate locomotor activity (Open Field), depressive-like behaviors (Forced Swimming, Preference for Sucrose), social preference (Social Interaction) and cognitive performance (Y Maze and Recognition of the New Object) and then had their brains dissected. The expressions of microglia and astrocytes markers were evaluated and the cytokines TNF- α and IL-1 β measured in the hippocampus. Furthermore, computational strategies were used to predict protein targets and molecular docking calculations. CUMS induced anxiogenic and depressive-like behaviors, cognitive deficit, high levels of TNF- α and IL-1 β cytokines, hypoactivation of astrocytes, seen by reduced expression of the GFAP marker and hyperactivation of microglia, with increased expression of the Iba-1 marker, in the hippocampus. These changes were reversed by treatment with RIP I or RIP II, showing their antidepressant, anxiolytic and anti-neuroinflammatory activity. Target prediction and molecular docking suggested NLRP3, ASC and P2X7 proteins as likely targets for RIP I and RIP II. In pharmacokinetic prediction, with analysis of physicochemical properties, RIP I and RIP II proved to be good drug candidates, with good oral availability and ability to cross the blood-brain barrier. RIP I and RIP II are likely inhibitors of isoforms of the liver enzymes CYP1A2 and CYP2D6, but they have not been shown to be substrates for P-glycoprotein. The presented results show the antidepressant potential of RIP I and RIP

II, with beneficial effects on behaviors related to anhedonia, social interaction and cognitive performance, facing exposure to chronic stress. This ability is related to the inhibition of inflammatory mechanisms, with emphasis on the ability to reverse damage associated with astrocytic and microglial alterations. The proposed mechanism of action through molecular docking seems to be related to the modulation of the P2X7-NLRP3-IL1 β pathway, probably in the NATCH domains of NLRP3, CARD of ASC and P2X7, as corroborated by the changes seen in the activity of glial cells and hippocampal levels of cytokines. RIP I and RIP II proved to be promising compared to the drugs available on the market for the treatment of depression.

Keywords: neuroinflammatory diseases; depression; astrocytes; microglia; NLR family, pyrin domain-containing 3 protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Critérios diagnósticos para o transtorno depressivo maior (DSM-V)	15
Figura 2	- Interação de células imunes com o eixo HHA na liberação de citocinas inflamatórias.....	17
Figura 3	- Representação dos componentes do inflamassoma NLRP3.....	21
Figura 4	- Sinalização e ativação de NLRP3	22
Figura 5	- Ativação de NLRP3 na micróglia por influência do receptor P2X7	23
Figura 6	- Localização (A) e estrutura (B) do hipocampo	25
Figura 7	- Estrutura química das Riparinas	29
Figura 8	- Representação esquemática do protocolo experimental	35
Figura 9	- Distribuição dos animais utilizados no protocolo experimental	37
Figura 10	- Estudo de encaixe para docking molecular da proteína NLRP3 pelo Autodocktools versão 1.5.6.....	43
Figura 11	- Estudo de encaixe para docking molecular da proteína ASC pelo Autodocktools versão 1.5.6.....	43
Figura 12	- Estudo de encaixe para docking molecular da proteína P2X7 pelo Autodocktools versão 1.5.6.	44
Figura 13	- Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI	47
Figura 14	- Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao ECI....	48
Figura 15	- Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência pela solução de sacarose em camundongos submetidos ao ECI	49
Figura 16	- Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência social no teste de interação social em camundongos submetidos ao ECI	50
Figura 17	- Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a porcentagem de alterações corretas no teste do labirinto em Y em camundongos	51

submetidos ao ECI	
Figura 18 - Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento no teste do reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI	52
Figura 19 - Efeito da administração de RIP I ou RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de GFAP em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI	53
Figura 20 - Efeito da administração de RIP I OU RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de Iba-1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI	56
Figura 21 - Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a concentração de TNF- α e IL-1 β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI	59
Figura 22 - Complexo RIP I e RIP II e proteína NLRP3 (Esquemas em 3D e 2D)	68
Figura 23 - Complexo RIP I e RIP II e proteína ASC (Esquemas em 3D e 2D)	70
Figura 24 - Complexo RIP I e RIP II e proteína P2X7 (Esquemas em 3D e 2D)	72
Figura 25 - Possível mecanismo de ação de RIP I e RIP II	90

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação das classes das 15 principais proteínas prováveis às quais RIP I pode se ligar para exercer seu efeito com base nos dados obtidos do servidor <i>Swiss Target Prediction</i>	60
Gráfico 2 - Representação das classes das 15 principais proteínas prováveis às quais RIP II pode se ligar para exercer seu efeito com base nos dados obtidos do servidor <i>Swiss Target Prediction</i>	61
Gráfico 3 - Radar de biobisponibilidade de RIP I (A) e RIP II (B)	74
Gráfico 4 - Correlação entre WLogP e TPSA, na forma de BOILED-Egg, para RIP I e RIP II	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A	- Prováveis alvos de ligação de RIP I obtidos do servidor <i>Swiss Target Prediction</i>	62
Tabela 1B	- Prováveis alvos de ligação de RIP II obtidos do servidor <i>Swiss Target Prediction</i>	63
Tabela 2A	- Prováveis alvos de ligação de RIP I obtidos do servidor <i>Similarity Ensemble Approach</i>	64
Tabela 2B	- Prováveis alvos de ligação de RIP II obtidos do servidor <i>Similarity Ensemble Approach</i>	65
Tabela 3	- Lista de parâmetros e pontuação gerados a partir de encaixe molecular da interação entre a proteína NLRP3 e RIP I ou RIP II	66
Tabela 4	- Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre RIP I e RIP II e a proteína NLRP3	67
Tabela 5	- Lista de parâmetros e pontuação gerados a partir de encaixe molecular da interação entre a proteína ASC e RIP I ou RIP II	69
Tabela 6	- Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre RIP I e RIP II e a proteína ASC	69
Tabela 7	- Lista de parâmetros e pontuação gerados a partir de encaixe molecular da interação entre a proteína P2X7 e RIP I ou RIP II	71
Tabela 8	- Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre RIP I e RIP II e a proteína P2X7	71
Tabela 9	- Regra dos 5 de Lipinski para RIP I e RIP II avaliada no servidor <i>Swiss ADME</i>	73
Tabela 10	- Propriedades físico-químicas de RIP I e RIP II avaliadas no servidor <i>Swiss ADME</i>	73
Tabela 11	- Propriedades ADME para RIP I e RIP II avaliadas no servidor <i>Swiss ADME</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein</i>
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ECI	Estresse Crônico Imprevisível
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FLU	Fluoxetina
GC	Glicocorticoides
GD	Giro Dentado
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HHA	Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal
Iba1	Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-18	Interleucina-18
LRR	Repetições ricas em leucinas
NATCH	Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NLRP3	Proteína 3 que Contém Domínio de Pirina da Família NLR
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PYD	Domínio de pirina
P2X7	Receptor Purinérgico 7
RIP	Riparina
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SEA	<i>Similarity Ensemble Approach</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VEI	Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Depressão: aspectos gerais	14
1.2	Fisiopatologia da depressão	15
<i>1.2.1</i>	<i>Hipótese Neuroinflamatória</i>	15
<i>1.2.2</i>	<i>Células gliais na depressão</i>	18
<i>1.2.2.1</i>	<i>Micróglia</i>	18
<i>1.2.2.2</i>	<i>Astrócitos</i>	19
<i>1.2.3</i>	<i>Inflamassoma NLRP3, receptor P2X7 e depressão</i>	20
<i>1.2.4</i>	<i>Hipocampo</i>	24
1.3	Modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI)	25
1.4	Ferramentas computacionais na pesquisa farmacológica	27
<i>1.4.1</i>	<i>Docking molecular</i>	27
<i>1.4.2</i>	<i>Predição farmacocinética</i>	28
1.5	Riparinas	28
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Animais	33
4.2	Substâncias utilizadas	33
4.3	Delineamento Experimental	34
4.4	Protocolo de indução de comportamento depressivo-símile por estresse crônico imprevisível (ECI)	35
4.5	Testes Comportamentais	36
<i>4.5.1</i>	<i>Campo Aberto</i>	36
<i>4.5.2</i>	<i>Nado Forçado</i>	37
<i>4.5.3</i>	<i>Preferencia pela solução de sacarose</i>	37
<i>4.5.4</i>	<i>Interação Social</i>	38
<i>4.5.5</i>	<i>Labirinto em Y</i>	38
<i>4.5.6</i>	<i>Reconhecimento do objeto novo</i>	39
4.6	Testes Neuroquímicos	40

4.6.1	<i>Eutanásia e obtenção do material biológico</i>	40
4.6.2	<i>Marcação de GFAP e Iba-1 por imunofluorescência</i>	40
4.6.3	<i>Determinação dos níveis de IL-1β e TNF-α</i>	41
4.7	Análise Estatística	41
4.8	Testes <i>in silico</i>	41
4.8.1	<i>Predição de alvos</i>	41
4.8.2	<i>Obtenção dos ligantes e proteínas</i>	42
4.8.3	<i>Preparação de ligantes e proteínas e estudos de encaixe</i>	42
4.8.4	<i>Docking molecular</i>	43
4.8.5	<i>Predição Farmacocinética</i>	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Testes Comportamentais	46
5.1.1	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI</i>	46
5.1.2	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao ECI</i>	48
5.1.3	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência pela solução de sacarose em camundongos submetidos ao ECI</i>	48
5.1.4	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência social no teste de interação social em camundongos submetidos ao ECI</i>	49
5.1.5	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a porcentagem de alterações corretas no teste do labirinto em Y em camundongos submetidos ao ECI</i>	50
5.1.6	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento no teste do reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI</i>	51
5.2	Testes Neuroquímicos	52
5.2.1	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de</i>	52

	<i>GFAP em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI</i>	
5.2.2	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de Iba-1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI</i>	56
5.2.3	<i>Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a concentração de TNF-α e IL-1β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI</i>	59
5.3	<i>Testes in silico</i>	60
5.3.1	<i>Predição de alvos</i>	60
5.3.2	<i>Cálculos de Docking molecular</i>	66
5.3.2.1	<i>Interação de RIP I e RIP II com a proteína NLRP3</i>	66
5.3.2.2	<i>Interação de RIP I e RIP II com a proteína ASC</i>	68
5.3.2.3	<i>Interação de RIP I e RIP II com a proteína P2X7</i>	70
5.3.3	<i>Predição Farmacocinética</i>	72
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO NA CEUA	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão: aspectos gerais

A depressão é uma doença comum em todo o mundo, com cerca de 280 milhões de pessoas afetadas. É uma das principais causas de incapacidade e perda de qualidade de vida, trazendo grande sofrimento ao indivíduo e baixo desempenho nas atividades diárias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Durante a pandemia por COVID-19, segundo um estudo realizado com mais de 45.000 brasileiros, 40,4% se sentiam tristes ou deprimidos com frequência ou o tempo todo e dos adultos que não tinham distúrbios do sono prévios, 43,5% passaram a apresentá-los. Embora o sentimento de tristeza seja comum ao ser humano e deva ser diferenciado de um transtorno depressivo, os resultados observados no estudo apontam para a necessidade de medidas de acompanhamento de saúde (BARROS *et al.*, 2020).

Estudos sobre a etiologia da depressão, embora não totalmente elucidativos, apontam o estresse como o principal fator ambiental relacionado à predisposição dos indivíduos a esse transtorno. A perda interpessoal e a rejeição social são os estressores mais envolvidos com a depressão, pois estão fortemente associados ao tipo de sofrimento emocional característico da doença (SLAVICH; IRWIN, 2014). De fato, a maior parte dos episódios diagnosticados como depressão são precedidos por um evento estressante de natureza diversa. Em um estudo longitudinal, 88,1% dos casos diagnosticados foram relacionados a um estressor, enquanto apenas 11,9% tinham origem endógena (KELLER; NEALE; KENDLER, 2007).

A sintomatologia é diversificada, de modo que o indivíduo pode apresentar sintomas físicos, relacionados ao humor, ao apetite ou ao sono, bem como alterações cognitivas. Com base nesses sintomas, o diagnóstico é essencialmente clínico e, de acordo com o *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais* (DSM-5), deve incluir pelo menos 5 dos nove sintomas listados (Figura 1), os quais devem estar presentes por pelo menos duas semanas, e que um deles seja, obrigatoriamente, humor deprimido ou perda de interesse/prazer (JESTE *et al.*, 2013).

Figura 1 – Critérios diagnósticos para o transtorno depressivo maior



Fonte: adaptado do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5)

1.2 Fisiopatologia da depressão

1.2.1 Hipótese Neuroinflamatória

A fisiopatologia da depressão não se encontra totalmente elucidada, embora diversas teorias tenham sido propostas. Destas, a teoria monoaminérgica é a mais conhecida, a qual afirma que há redução nos níveis cerebrais de serotonina e noradrenalina e, em menor extensão, dopamina no cérebro de pacientes deprimidos (ANDREWS *et al.*, 2015).

A teoria monoaminérgica, no entanto, não explica exhaustivamente as alterações encontradas nos transtornos depressivos. Por isso, diversas outras hipóteses têm sido desenvolvidas, que possam explicar com mais clareza as vias cerebrais envolvidas, incluindo o envolvimento das neurotrofinas (CAVIEDES *et al.*, 2017), do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (ZUNSZAIN *et al.*, 2011), do estresse oxidativo (BAKUNINA, 2015), da disfunção glutamatérgica (HAROON; MILLER; SANACORA, 2017) e da neuroinflamação (MAES *et al.*, 2011).

A depressão tem sido interpretada como uma doença inflamatória caracterizada por ativação imune mediada por células, que geralmente é desencadeada pelo estresse. Há fortes evidências de que processos inflamatórios mediados por citocinas estão relacionados ao

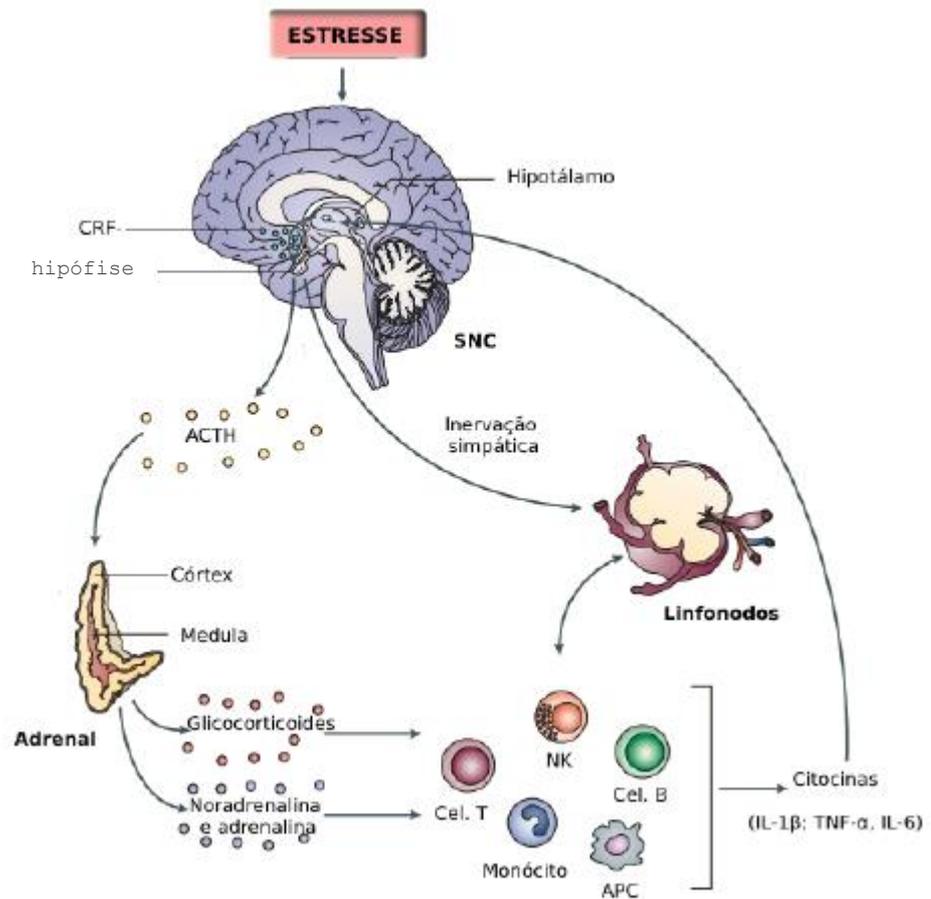
aparecimento de sintomas do tipo depressivo (ZUNSZAIN *et al.*, 2011). A depressão tem alta prevalência em doenças autoimunes e infecciosas, e essa comorbidade não pode ser atribuída somente ao estresse do aparecimento da doença (PRYCE; FONTANA, 2017; SIEGMANN *et al.*, 2018). Além disso, pacientes depressivos apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, proteínas de fase aguda, quimiocinas e moléculas de adesão. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), estão em níveis elevados em pacientes depressivos, sendo vistos como biomarcadores confiáveis da inflamação relacionados com a doença (CASSANO *et al.*, 2017; DOWLATI *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2009; ZUNSZAIN *et al.*, 2011).

Evidências têm apontado uma relação entre a presença das citocinas IL-1 β e TNF- α e sintomas como anedonia, fadiga, comprometimento psicomotor e aumento da sensibilidade à ameaça (ansiedade). Além disso, a inflamação tem sido associada à não responsividade ao tratamento com antidepressivos, visto que 45% dos pacientes que não respondem apresentaram proteína C reativa (PCR) acima dos níveis amplamente aceitos (RAISON *et al.*, 2013; AU *et al.*, 2015; MILLER; RAISON, 2016; MORRIS; CUTHBERT, 2012).

A hipótese neuroinflamatória, ou das citocinas, sugere que estressores externos, ou psicossociais, e estressores internos como condições inflamatórias, podem levar à depressão via processos inflamatórios (MAES *et al.*, 2009). Estudos com animais têm dado evidências da participação das citocinas no contexto do estresse e depressão. Camundongos expostos ao estresse crônico moderado mostraram níveis aumentados de IL-1 β no hipocampo, em conjunto com o desenvolvimento de mudanças comportamentais típicas da depressão, como diminuição da preferência por sacarose e redução da exploração social. Além disso, a deleção do receptor de IL-1 previne o aparecimento dessas mudanças causadas pela exposição crônica ao estresse (GOSHEN *et al.*, 2008; KOO; DUMAN, 2008).

A correlação entre citocinas, estresse e depressão ainda não é totalmente conhecida, no entanto, sabe-se que se configura como uma via de mão dupla (Figura 2). Citocinas podem ativar o eixo HHA, causando uma elevação nos níveis de glicocorticoides (GC), e ao mesmo tempo, podem inibir a função dos receptores glicocorticoides (GR), seja por translocação ou indução de isoformas com menor capacidade de ligação ao ligante. Além disso, o estresse crônico é acompanhado por resistência aos GC e ativação dos mecanismos pró-inflamatórios, mesmo com a expressão normal de mRNA de GR e a produção excessiva de GC (BEUREL *et al.*, 2020; PACE; HU; MILLER, 2007; ZUNSZAIN *et al.*, 2011).

Figura 2 - Interação de células imunes com o eixo HHA na liberação de citocinas inflamatórias



Fonte: CHAVES (2019). Em situação de estresse, há a estimulação do eixo HHA, com produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, resultando na produção de hormônios glicocorticóides pela glândula adrenal, bem como das catecolaminas adrenalina e noradrenalina. Os leucócitos possuem receptores para os hormônios do estresse (glicocorticóides) e podem ser modulados pela ligação desses hormônios aos seus respectivos receptores, ou por inervação simpática nos linfonodos. As citocinas produzidas pelas células imunes podem modular a atividade do hipotálamo, ativando o eixo HHA, o que indica uma interação bidirecional. Legenda: HHA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; APC: célula apresentadora de antígeno NK, células natural killer.

Uma típica resposta inflamatória consiste em quatro componentes principais: (1) indutores inflamatórios, representados pelos padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou associados a patógenos (PAMPs); (2) sensores que detectam os DAMPs ou PAMPs; (3) mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores, como é o caso das citocinas, quimiocinas e prostaglandinas e (4) tecido alvo afetado pelos mediadores inflamatórios. O fenômeno inflamatório observado em doenças neuropsiquiátricas, como a depressão, é compatível com uma inflamação estéril, ocasionada após estressores físicos ou psicológicos (BAUER; TEIXEIRA, 2019).

Em nível periférico, a inflamação envolve monócitos, neutrófilos e macrófagos, a cascata do complemento, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) nos locais de infecção ou dano. A neuroinflamação é o processo de interação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o sistema imunológico. Deriva do processo de lesão causada por infecção, estresse psicológico ou físico, resultando na ativação de células imunes inatas do cérebro, como micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, produzindo citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios (BAUER; TEIXEIRA, 2019; MAES *et al.*, 2011; TROUBAT *et al.*, 2021; YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015).

1.2.2 Células gliais na depressão

1.2.2.1 Micróglia

As micróglia, mais conhecidas como as células imunes do SNC, compõem cerca de 10% das células cerebrais e desempenham papéis importantes não apenas na infecção, como também na memória, neurogênese e plasticidade sináptica. A micróglia é funcional e morfologicamente dinâmica. Por sua ampla distribuição, sabe-se que desempenha um papel fundamental no reconhecimento de “sinais de perigo” (*danger signals*), como purinas, citocinas pró-inflamatórias e fatores de necrose celular (YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015).

Em condições normais, a micróglia permanece em um fenótipo ramificado quiescente, porém grandemente dinâmico e desempenha funções como produção de neurotrofinas, fagocitose de restos celulares e controle das sinapses excitatórias. No entanto, na presença de lesão ou infecção, a micróglia assume um fenótipo amebóide ativo e secreta citocinas pró-inflamatórias e radicais reativos, processo conhecido como ativação clássica (DUBELAAR, 2018; CHAVES-FILHO *et al.*, 2019)

Embora a ativação da micróglia seja frequentemente considerada uma resposta imunológica necessária e benéfica a sinais de perigo dentro do microambiente, a ativação excessiva e/ou prolongada tem sido associada ao desenvolvimento de várias doenças (SANTIAGO *et al.*, 2017; SUBRAMANIAM; FEDEROFF, 2017)

Estudos já demonstraram que o estresse promove a transição morfológica da micróglia de um estado de repouso ramificado para um estado ativado, caracterizado por um aumento na densidade de material imunorreativo para um marcador de ativação específico da micróglia. Além disso, há evidências de que essa resposta pode ser regionalmente específica e variar em

magnitude ao longo do tempo (BLANDINO *et al.*, 2009; SUGAMA; KAKINUMA, 2020; TYNAN *et al.*, 2010).

Evidências não clínicas já demonstraram a relação da micróglia com o desenvolvimento de características similares à depressão. Foi mostrado que CD11b, conhecido por ser expresso por células da imunidade periférica e micróglia, está aumentado em várias estruturas cerebrais associadas à depressão, como o hipocampo e amígdala, em camundongos expostos a estresse crônico imprevisível (FAROOQ *et al.*, 2012).

Além disso, algumas evidências clínicas mostram que o estado microglial é alterado em alguns pacientes deprimidos, particularmente relacionados a suicídio (STEINER *et al.*, 2008). Ademais, citocinas pró-inflamatórias, cuja principal fonte cerebral é a micróglia, estão aumentadas no líquido cefalorraquidiano de pacientes deprimidos (DOWLATI *et al.*, 2010; HOWREN; LAMKIN; SULS, 2009). Some-se ainda que uma grande porcentagem de pacientes com câncer ou hepatite C que recebem imunoterapia com IFN α , que ativa a micróglia, desenvolvem sintomas depressivos (RAISON; CAPURON; MILLER, 2006).

A molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (Iba-1) é um marcador microglial específico, constitutivamente expresso, que é regulado positivamente como resultado da ativação da micróglia. Iba1 pode remodelar o citoesqueleto de actina e contribuir para alterações morfológicas que se correlacionam a vários estados microgliais (HOVENS; NYAKAS; SCHOEMAKER, 2014).

1.2.2.2 Astrócitos

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células da glia e possuem funções importantes para a homeostase, que incluem a manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, a capacidade proliferativa para formar cicatriz glial ao redor das lesões e a produção e liberação de fatores tróficos que contribuem para a sobrevivência de neurônios (SOFRONIEW; VINTERS, 2010; VOLTERRA; MELDOLESI, 2005).

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é a subunidade proteica de filamentos intermediários do citoesqueleto de células da glia, sendo principalmente encontrada em astrócitos diferenciados, podendo ser utilizada como marcador. Quando ativados, astrócitos têm sua estrutura modificada, resultando em aumento da expressão de GFAP, também chamada de gliose reativa. Os astrócitos, além de participar da liberação de citocinas e quimiocinas, também participam da produção da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), expressão de moléculas de adesão e inibição da liberação de IL 12 (LI *et al.*, 2020a;

MIDDELDORP; HOL, 2011).

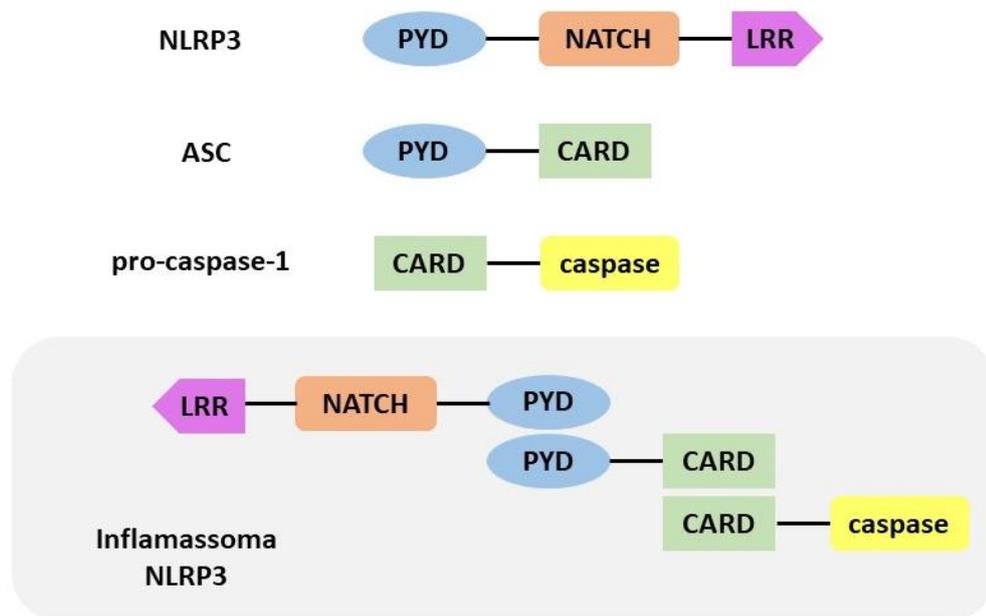
Evidências crescentes indicam que a disfunção astrocítica está ativamente envolvida na patogênese da depressão (RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013; SANACORA; BANASR, 2013). Diminuição do número de astrócitos do hipocampo foi observado em roedores submetidos a estresse crônico imprevisível e separação materna (COBB *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2009). Estudos *post mortem* de tecidos de pacientes deprimidos descrevem números reduzidos de astrócitos no cérebro, e essas reduções são suportadas pelo achado de que a expressão de GFAP é reduzida por estresses crônicos no córtex pré-frontal e no hipocampo (ARAYA-CALLÍS *et al.*, 2012; CHANDLEY *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2020; MÉNARD; HODES; RUSSO, 2016; NAGY *et al.*, 2015). Por outro lado, alguns estudos relacionam a depressão à alta expressão de GFAP, o qual pode refletir uma reação compensatória ao dano neuronal, especialmente a longo prazo (COBB *et al.*, 2013; RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013).

1.2.3 Inflamassoma NLRP3, receptor P2X7 e depressão

Na resposta inflamatória, o sistema imune, por meio da resposta imune inata age a partir do reconhecimento de PAMPs e DAMPs, cujo reconhecimento é feito através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), expressos em células como a micróglia. Dentre os diferentes tipos de PRRs, o mais bem descrito é o inflamassoma. Trata-se de um complexo multiproteico intracelular, localizado no citoplasma das células, responsável pela clivagem e ativação de caspases, especialmente a caspase-1, que exerce um papel fundamental no processamento e maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e em uma forma de morte pró-inflamatória rápida chamada de piroptose (JIN; FLAVELL, 2010; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009).

O inflamassoma mais estudado e bem caracterizado é o NLRP3 (do inglês, NLR family pyrin domain containing 3), pertencente à família de receptores do tipo NOD, constituído por três partes (Figura 3): um domínio C terminal composto por repetições ricas em leucinas (LRR); um domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NATCH), centralmente localizado que regula a auto-oligomerização; um domínio de pirina N-terminal (PYD) que recruta a proteína adaptadora ASC, responsável pela ligação à pró-caspase 1 (JIN; FLAVELL, 2010; SWANSON; DENG; TING, 2019).

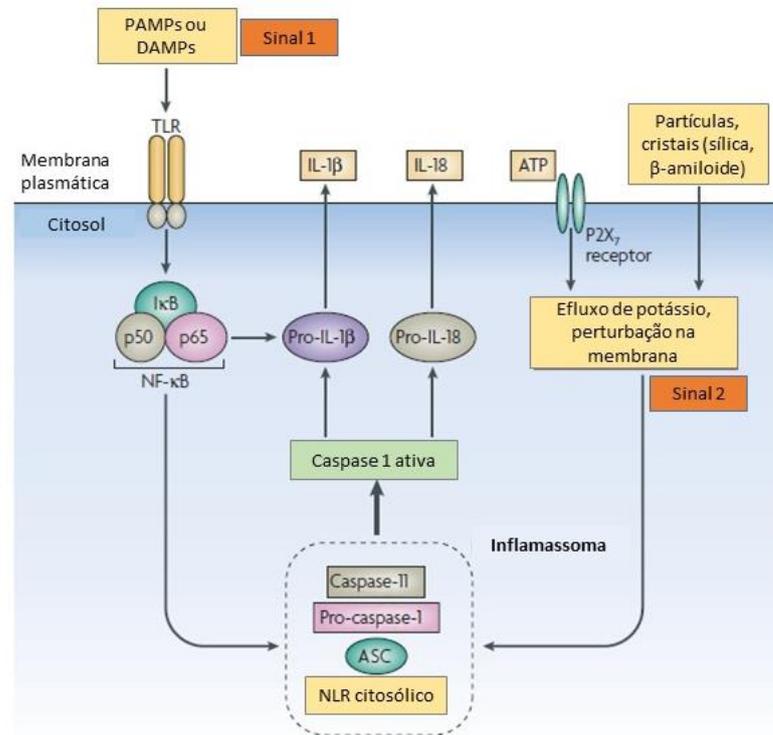
Figura 3 – Representação dos componentes do inflamassoma NLRP3



Fonte: Adaptado de RONCALHO (2022). LRR: domínio de repetições ricas em leucinas (*leucine-rich repeats*); NATCH: domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos; PYD: domínio pirina (*pyrin domain*); CARD: domínio recrutador de caspase (*caspase recruitment domain*); ASC: proteína adaptadora (*apoptosis-associated speck-like protein*).

A ativação do inflamassoma depende de dois sinais (Figura 4). Primeiramente, ocorre o reconhecimento de DAMPs ou PAMPs pelos receptores TLRs, comumente pelo TLR-4, o qual induz uma sinalização intracelular nas células microgliciais levando à ativação e translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo onde ele estimula a transcrição dos genes das formas imaturas de IL-1 β e IL-18 e os próprios componentes do inflamassoma. Um segundo sinal, que podem ser DAMPs, EROs ou outros estímulos não conhecidos, é necessário para induzir a oligomerização dos NLRs seguido pelo recrutamento da proteína adaptadora ASC e o recrutamento e ativação da pró-caspase-1 em caspase-1 madura. Uma vez que a caspase-1 é ativada, o inflamassoma NLRP3 pode processar as pró-formas de IL-1 β e IL-18 em interleucinas maduras que são liberadas e podem atuar como mediadores pró inflamatórios (MARIATHASAN; MONACK, 2007; SWANSON; DENG; TING, 2019).

Figura 4 – Sinalização e ativação de NLRP3



Fonte: Adaptado de MARIATHASAN; MONACK (2007). No sinal 1, a estimulação de células imunes pode ocorrer pela ligação de PAMPs ou DAMPs a receptores, por exemplo do tipo toll-like (TLR), ativando o fator nuclear κ B (NF- κ B) e induzindo a síntese de pró-interleucina-1 β (pró-IL-1 β) e componentes do inflamassoma. Este sinal prepara as células para a ativação da caspase-1, pró-IL-1 β e pró-IL-18 e subsequente liberação de citocina madura. No sinal 2, agentes diversos podem causar perturbações iônicas, especificamente efluxo de potássio. O ATP, ativando o receptor purinérgico P2X7 é o principal exemplo. NLR: Receptor do tipo NOD.

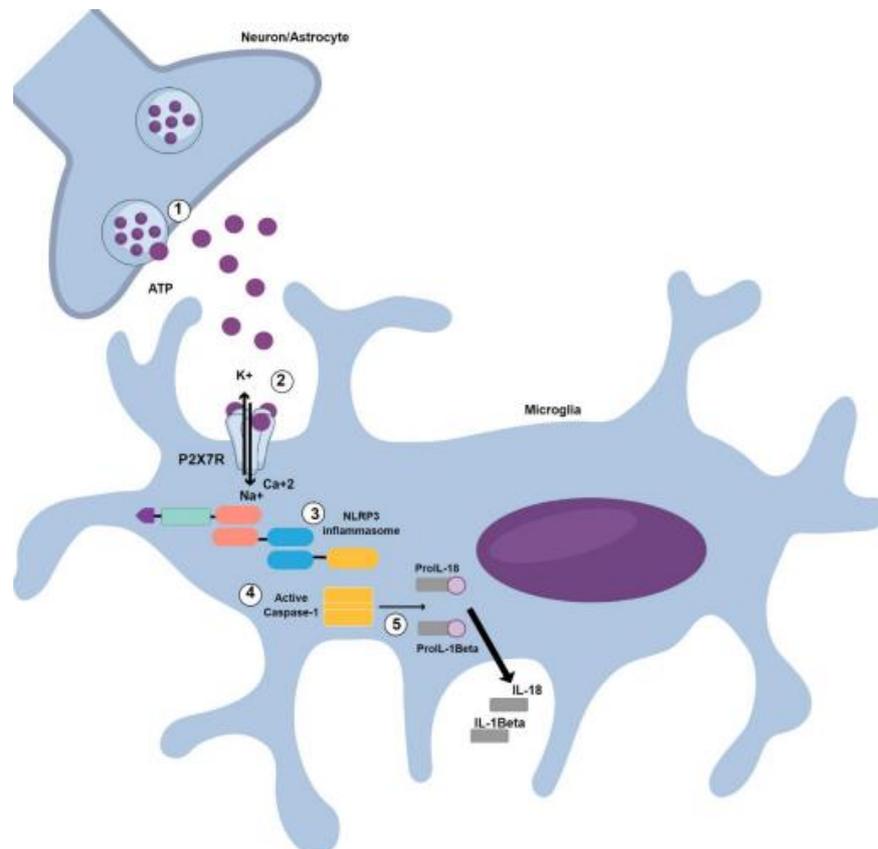
Os sinais que levam à união dos componentes do inflamassoma NLRP3 ainda são pouco elucidados. PAMPs como vírus e bactérias, além de diversos DAMPs foram indicados como ativadores do inflamassoma, assim como o efluxo de K^+ causado pela ativação dos receptores de adenosina trifosfato (ATP) do subtipo P2X7, cristais de sílica, de ureia e o peptídeo β -amiloide (HALLE *et al.*, 2008; HORNUNG *et al.*, 2008; MARIATHASAN; MONACK, 2007; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Além disso, a sinalização mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) e o excesso de glicocorticoides também parecem estar envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 (FRANK *et al.*, 2014; HARIJITH; EBENEZER; NATARAJAN, 2014).

O P2X7 é um receptor ionotrópico ativado por ATP, presente na membrana microglial, sendo o mais estudado no contexto de transtornos psiquiátricos, dentre os receptores

purinérgicos. Com uma cauda N-terminal curta, 2 domínios transmembrânicos ligados por uma alça extracelular e uma cauda C-terminal longa, composta por 239 aminoácidos (em contraste com os 27-129 aminoácidos que formam a cauda C-terminal dos outros receptores P2X), os receptores P2X7 requerem uma concentração de ATP cerca de 100 vezes maior do que a dos outros receptores P2X para a sua ativação, sendo, portanto, ativados em situações em que há altos níveis de ATP (VOLONTÉ *et al.*, 2012).

A exposição a eventos estressores (psicológicos ou físicos) é capaz de causar um aumento na liberação de ATP, o que pode ser interpretado como um DAMP pelo sistema imune no SNC, ativando os receptores P2X7, altamente expressos na micróglia. Essa ativação permite o influxo de Ca^{2+} e Na^+ , bem como o efluxo de K^+ , sendo a diminuição deste último íon no microambiente citosólico um gatilho para a ativação do inflamassoma NLRP3 que culmina na liberação das citocinas pró-inflamatórias (CISNEROS-MEJORADO *et al.*, 2015) (Figura 5).

Figura 5 – Ativação de NLRP3 na micróglia por influência do receptor P2X7



Fonte: RONCALHO (2022). 1: ATP liberado de neurônios e/ou astrócitos ativam os receptores P2X7 localizados nas micróglias; 2: Ativação de P2X7 tem como consequência o efluxo de K^+ , gatilho para a oligomerização e montagem do inflamassoma; 3: Inflamassoma NLRP3 é um mediador da ativação de caspase-1; 5: caspase-1 cliva as formas precursoras de IL-1 β e IL-18, sendo as formas ativas liberadas no espaço extracelular.

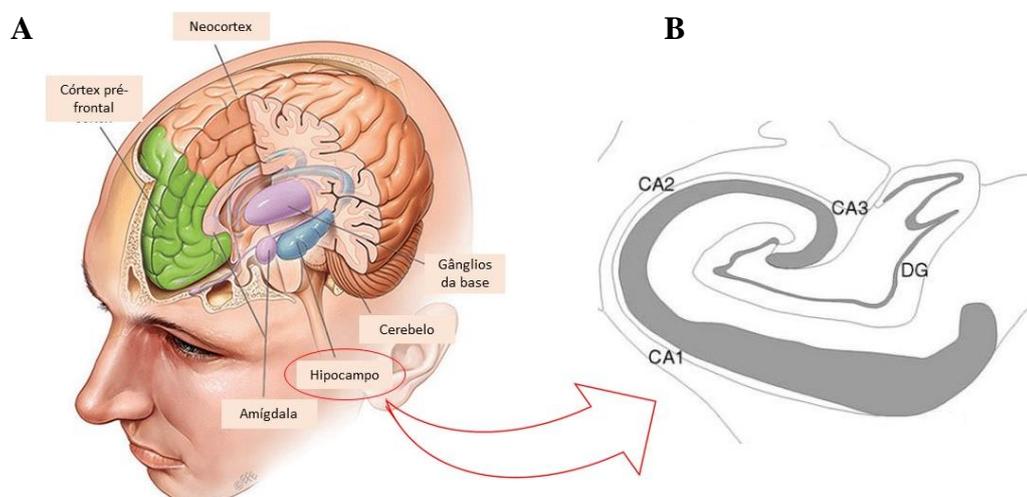
Várias evidências sugerem que a fisiopatologia da depressão pode estar associada ao inflamassoma NLRP3, e sua ativação consegue relacionar o papel das citocinas, estresse psicológico e depressão (ARIOZ *et al.*, 2019; IWATA *et al.*, 2016; MASLANIK *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2014). O inflamassoma NLRP3 ativado já foi detectado em células mononucleares de pacientes com Transtorno Depressivo Maior (TDM) (ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2014). Outros estudos sugeriram que a depressão resulta da ativação do inflamassoma NLRP3 no hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos e camundongos submetidos a modelos de estresse crônico (PAN *et al.*, 2014; SU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2021).

Resultados em conjunto indicam que a ativação do NLRP3 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do comportamento depressivo e nas alterações celulares e moleculares associadas à depressão. Dados sugerem que o inflamassoma é provavelmente um elemento central no desenvolvimento de comportamentos depressivos induzidos pelo estresse e, portanto, pode representar um novo alvo terapêutico para gerenciar a depressão (ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2014, 2016).

1.2.4 Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura cerebral pertencente ao sistema límbico, localizada no lobo temporal medial, em ambos os hemistérios. Consiste em duas lâminas: o *gyrus dentatus* (Giro dentado - GD) e o cornu ammonis (Corno de Amon – CA: três subáreas – CA1, CA2, CA3), e tem vasta conexão com o neocórtex e outras áreas do sistema límbico, como a amígdala (Figuras 6A e 6B). Sua principal função está relacionada à memória, contudo, estudos recentes têm atribuído um papel também na regulação do estresse e do humor (BLISS, 2007; MASI; BROVEDANI, 2011).

Figura 6 – Localização (A) e estrutura (B) do hipocampo



Fonte: A) Adaptado de *Levent Efe*, disponível em: <https://italo.com.br/blog/italo/memoria/>; B) Adaptado de Bliss et al. (2007).

O hipocampo é a região cerebral mais comumente estudada na pesquisa da depressão. Sabe-se que o hipocampo contém altos níveis de receptores de glicocorticóides e glutamato e regula o eixo HHA, o que o torna mais suscetível ao estresse e à depressão, tendo sua plasticidade afetada, principalmente no que diz respeito a alteração de volume, neurogênese e apoptose (LIU et al., 2017). Estudos mostraram que o estresse crônico prejudica a memória explícita dependente do hipocampo em modelos animais de depressão e esse efeito pode estar relacionado a mudanças na plasticidade sináptica do hipocampo, diminuindo a potencialização de longo prazo (LTP) e aumentando a depressão de longo prazo (LTD) (GOSHEN et al., 2008; KOO; DUMAN, 2008; PRICE; DUMAN, 2020).

1.3 Modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI)

Modelos animais são comumente utilizados como uma maneira eficiente de estudar a etiologia de desordens humanas, por permitir a associação de sintomas encontrados em humanos às alterações comportamentais e neuroquímicas encontradas nos animais. No entanto, na depressão essa correlação torna-se por vezes, difícil, visto que os sintomas são frequentemente subjetivos e variáveis. Portanto, para que um modelo animal de depressão seja útil, ele deve apresentar maneiras de avaliar o grau de semelhança com este distúrbio clínico. Sendo assim, o modelo deverá compreender uma série de critérios estabelecidos para

a sua validade (WILLNER, 2016, 2017).

A depressão é considerada um distúrbio relacionado ao estresse, havendo robusta evidência de que o início e a recidiva podem ser precipitados por estresse repetido ou experiências estressantes graves. Além da depressão, o estresse é um dos principais contribuintes para as doenças neuropsiquiátricas, como transtornos de ansiedade, entre eles o transtorno de estresse pós-traumático, e disfunções de memória e aprendizagem. O modelo de estresse crônico imprevisível (ECI), portanto, tem se mostrado útil para o estudo da depressão (MEHTA; PARASHAR; UDAYABANU, 2017; NORMANDEAU *et al.*, 2018).

O modelo ECI foi inicialmente proposto por Katz em 1982 para utilização em ratos, sendo posteriormente modificado por Papp e Willner, e é considerado um dos modelos animais mais úteis para avaliar atividade antidepressiva. O ECI possui validade de face, constructo e preditiva, e responde a administração de antidepressivos (WILLNER, 2017). O modelo também foi validado em camundongos, tendo um alto valor translacional, pois induz alterações moleculares semelhantes às observadas em pacientes deprimidos (HERVÉ *et al.*, 2017).

O ECI consiste na exposição do animal a uma série de estressores, ao longo de várias semanas, em momentos imprevisíveis. Observa-se, então, o desenvolvimento de alterações comportamentais como anedonia e apatia, além de alterações endócrinas e neurais que se assemelham às encontradas em indivíduos com transtornos depressivos (WILLNER, 2016, 2017).

Diversos estudos mostram alterações, em consequência da aplicação do modelo, em parâmetros como tempo de imobilidade no teste do nado forçado, redução da preferência pelo consumo de sacarose (DE SOUZA *et al.*, 2022), 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 e nitrito (RINWA; KUMAR, 2012).

A depressão também cursa com alterações na resposta inflamatória, bem como na estrutura de componentes cerebrais e o ECI têm se mostrado útil para a investigação dessas alterações. O ECI reduz o metabolismo glial e a expressão do mRNA da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um marcador de astrócitos no cérebro de ratos (BANASR *et al.*, 2010). O estresse crônico também aumenta o número de células positivas para Iba-1, um marcador de microglia, em áreas cerebrais de camundongos (DE SOUZA *et al.*, 2022).

Esses e outros achados mostram a confiabilidade desse modelo para o estudo de diversos aspectos comportamentais encontrados na depressão, bem como alterações

neuroquímicas, incluindo a neuroinflamação induzida pelo estresse (FAROOQ *et al.*, 2012; NOLLET, 2021).

1.4 Ferramentas computacionais na pesquisa farmacológica

1.4.1 Docking molecular

No desenvolvimento de fármacos, o grande objetivo é determinar compostos com capacidade de promover ou inibir determinada ação biológica, normalmente mediada por um receptor ou enzima. O desenvolvimento de um composto com característica desejável envolve etapas não clínicas e clínicas, que podem demorar em média 15 anos. As abordagens computacionais ocupam um lugar de importância nas estratégias de desenvolvimento de fármacos, provendo informações valiosas a respeito das interações moleculares entre compostos com potencial farmacológico e seus alvos (LOHNING *et al.*, 2017).

As ferramentas de *docking* molecular são capazes de fornecer as interações existentes entre uma molécula de interesse, chamada de ligante, e um receptor-alvo, a partir de algoritmos de busca e funções de pontuação. Considerado um modelo *in silico*, pode ser utilizado para prever modos de ‘encaixe’, comparando e ranqueando as conformações obtidas na interação ligante-proteína. Este processo consiste primeiramente na busca da orientação molecular de um ligante dentro de um receptor, seguida por uma função de pontuação que representa a afinidade de ligação (FERREIRA *et al.*, 2015).

As etapas de realização do *docking* molecular consistem em 1) obtenção do ligante ou molécula de interesse, que pode estar disponível em bancos de dados ou deve ser desenhado, e sua consequente preparação; 2) obtenção da proteína-alvo de bancos de dados ou por meio de modelagem por homologia e sua preparação; 3) estimativa da energia de ligação do complexo proteína-ligante; 4) validação; 5) análise dos resultados (LOHNING *et al.*, 2017).

Na prática, a realização das simulações de *docking* molecular requer um método de busca para explorar o espaço conformacional disponível para o sistema e um campo de força para avaliar a energia de cada conformação. Para isso, existem disponíveis diversas ferramentas online, dentre as quais, uma das mais utilizadas é o pacote *Autodock tools* e *Vina* que apresentam diferentes funções de pontuação para estimativa de interação ligante-receptor, possuindo velocidade e precisão na realização dos cálculos (QUIROGA; VILLARREAL, 2016).

1.4.2 Predição farmacocinética

Durante o longo processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, a investigação de aspectos farmacocinéticos é de fundamental importância já nas etapas iniciais, visto que a maioria das falhas são relacionadas aos processos de ADME (absorção, distribuição, metabolismo, excreção), e não de eficácia (DONG et al., 2018). Lipinski foi um dos pioneiros em analisar as características físico-químicas de um composto e relacioná-las a sua disponibilidade oral, o que ficou conhecido como 'Regra dos cinco'. Esta estabelece que um bom candidato a fármaco, com boa disponibilidade oral, precisa apresentar as seguintes características: ter massa molecular menor ou igual a 500 Da, possuir log P menor ou igual a 5, não ultrapassar 5 grupos doadores de hidrogênio e 10 aceptores de hidrogênio (LIPINSKI et al., 2001).

Modelos computacionais têm sido promovidos como uma alternativa válida a procedimentos experimentais para predição de ADME, especialmente em etapas iniciais, quando investigadas substâncias químicas. Uma grande variedade de métodos *in silico* compartilham o objetivo de prever parâmetros de ADME a partir da estrutura molecular. Atualmente, existem várias ferramentas computacionais gratuitas e comerciais para avaliar propriedades ADME. Essas ferramentas são capazes de prever propriedades físico-químicas, permeabilidade gastrointestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica, ligação a proteínas plasmáticas, afinidade por proteínas transportadoras, depuração metabólica e potencial para inibir ou induzir enzimas metabolizadoras de drogas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

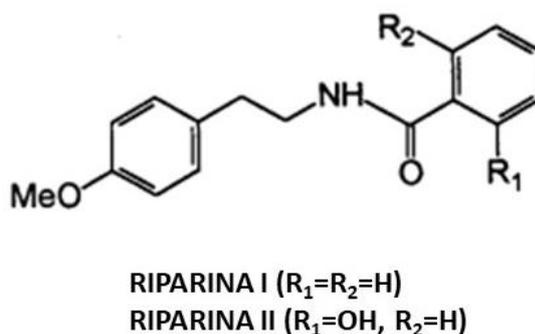
A ferramenta *SwissADME*, disponível gratuitamente, é um sistema eficaz na predição ADME de diversas moléculas a partir de modelos preditivos rápidos e robustos, para propriedades físico-químicas, farmacocinética e semelhança com drogas, fornecendo informações claras e acessíveis, por meio de métodos como o BOILED-Egg, iLOGP e Radar de Biodisponibilidade (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; DAINA; ZOETE, 2016).

1.5 Riparinas

Riparina I [(O-Metil)-N-benzoil-tiramina] (RIP I) e Riparina II [(O-Metil)-N-2-hidroxi-benzoil-tiramina] (RIP II), inicialmente isoladas do fruto verde de *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) e, posteriormente obtidas por síntese por Barbosa *et al.* (1987), são alcaloides naturais, uma classe especial de alcaloides, contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza. São consideradas compostos bioativos, sendo formadas da

união da tiramina (uma feniletilamina) com o ácido benzoico. RIP II difere de RIP I por apresentar uma hidroxila como substituinte no ácido benzoico (Figura 7). A tiramina é uma amina simpaticomimética de ação indireta que causa liberação de catecolaminas armazenadas (STAHL, 2014).

Figura 7 – Estrutura química das Riparinas



Fonte: Castelo-Branco *et al.* (2000).

Em estudos prévios do nosso grupo, RIP I e RIP II, administradas agudamente, apresentaram efeitos sobre o Sistema Nervoso Central, incluindo atividade ansiolítica, antidepressiva e antioxidante, além de anti-inflamatória e antinociceptiva. O efeito antidepressivo parece ser mediado por uma interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D1 e D2), noradrenérgico (receptor α_1) e serotoninérgico (receptor 5-HT_{1A}). O efeito antioxidante é relacionado à melhora dos sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos e à redução da peroxidação lipídica (DE SOUSA *et al.*, 2005, 2007, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Ademais, RIP I e RIP II apresentaram atividade antidepressiva em animais submetidos ao modelo de depressão induzida por administração crônica de corticosterona, mostrando também melhora no comportamento ansioso e déficit cognitivo em testes comportamentais, além de aumentar os níveis de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), sugerindo que sua atividade antidepressiva esteja relacionada à estimulação da produção de fatores neurotróficos (LOPES *et al.*, 2018; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A toxicologia pré-clínica de RIP I e RIP II foi determinada por intermédio de citotoxicidade utilizando MTT (Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), CAN (Ácidos Nucleicos Totais) e CVN (Captação do Vermelho Neutro). Não foram observadas alterações no citoplasma ou no núcleo das células tratadas com as riparinas

que sugerissem morte celular por apoptose ou necrose. A RIP I e RIP II não causaram perda da integridade da membrana celular, não induziram fragmentação do DNA nem promoveram parada no ciclo celular, sendo consideradas substâncias de baixa toxicidade (SILVEIRA, 2007).

Diante de resultados expressivos, torna-se evidente a relevância de investigar os mecanismos pelos quais RIP I e RIP II exercem seu efeito antidepressivo, com ênfase na hipótese neuroinflamatória da depressão, e sua atividade sobre micróglia e astrócitos.

2 JUSTIFICATIVA

A depressão é um transtorno de humor crônico e severo que afeta homens e mulheres de todas as idades, causando um enorme impacto pessoal, social e econômico. Por ser uma doença complexa e heterogênea, torna-se difícil definir, diagnosticar e tratar.

Atualmente, os antidepressivos disponíveis, apesar de amplamente prescritos para transtornos relacionados ao humor e ansiedade, apresentam limitações significativas. Entre estes, um longo intervalo de tempo para o início da resposta terapêutica e baixas taxas de resposta (apenas um terço dos pacientes responde ao primeiro medicamento e até dois terços respondem a vários medicamentos). Isso é particularmente problemático para uma doença associada a altas taxas de suicídio (OTTE *et al.*, 2016; PATEL, 2016). Além disso, mesmo com o tratamento prolongado, alguns pacientes tendem a apresentar recidivas e pouca melhora dos sintomas cognitivos (BAUNE; BRIGNONE; LARSEN, 2018; MCINTYRE *et al.*, 2013). 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 na fisiopatologia da depressão, podendo estar relacionada também à resposta ao tratamento (UHER *et al.*, 2014). O Estresse Crônico Imprevisível (ECI) é um modelo validado de depressão, que ocorre por meio da indução de neuroinflamação. Assim, o estudo da atividade das Riparinas I e II sobre a neuroinflamação, usando o modelo de ECI, mostra-se muito promissor.

Além disso, em estudos prévios, Riparina I e Riparina II apresentaram atividade ansiolítica, antidepressiva e antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva. Ainda, a administração subcrônica de Riparina I e Riparina II em camundongos submetidos ao modelo de estresse crônico induzido por corticosterona foi capaz de reverter comportamento tipo depressivo, ansioso e déficit cognitivo, além de reverter parâmetros de estresse oxidativo e aumentar os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos, sugerindo que sua atividade antidepressiva pode estar relacionada à estimulação da produção de fatores neurotróficos (DE SOUSA *et al.*, 2005, 2007, 2014; LOPES *et al.*, 2018; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Diante do rico potencial farmacológico de Riparina I e Riparina II e de sua atividade antidepressiva já demonstrada, torna-se relevante investigar, mais detalhadamente, as vias pelas quais essas substâncias exercem seu efeito antidepressivo, com ênfase na hipótese neuroinflamatória da depressão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito de Riparina I (RIP I) e Riparina II (RIP II) sobre a resposta neuroinflamatória e alterações gliais em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível (ECI).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de RIP I e RIP II sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiogênico e depressivo símile, provocados pelo ECI, em camundongos;
- Determinar o efeito de RIP I e RIP II sobre a performance cognitiva de camundongos submetidos ao ECI;
- Investigar o efeito de RIP I e RIP II sobre a expressão de marcadores de astrócitos (GFAP) e de micróglia (Iba1) em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI;
- Determinar o efeito de RIP I e RIP II sobre a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI;
- Realizar a predição farmacocinética de RIP I e RIP II;
- Realizar a predição dos alvos biológicos de RIP I e RIP II e *docking* molecular com as proteínas NLRP3, ASC e P2X7.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 22 e 26 g, com idade aproximada de 8 a 10 semanas, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno, com temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro alternado de doze horas, recebendo ração padrão e água à vontade, exceto nos períodos de estresse para indução de comportamento tipo depressivo, conforme protocolo experimental descrito adiante.

Os experimentos foram realizados após aprovação do projeto (Nº protocolo: 7608051018/2018) (Anexo A) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará. Os protocolos experimentais seguiram os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais usados nos experimentos.

4.2 Substâncias utilizadas

Riparina I e Riparina II, provenientes do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil) foram dissolvidas em água destilada, contendo 2% de Tween® 80, e administradas na dose de 50 mg/kg, por gavagem. A via de administração e a dose foram selecionadas a partir de estudos prévios (DE SOUSA *et al.*, 2014b; LOPES *et al.*, 2018; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Fluoxetina (Lilly®, Indiana, EUA), utilizada como o antidepressivo padrão, foi dissolvida em água destilada e administrada por gavagem, na dose de 10mg/kg (GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2014). A administração de todas as substâncias foi feita em um volume de 10 ml/kg de peso do animal.

4.3 Delineamento Experimental

O protocolo (Figura 8) foi proposto para avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração de Riparina I e Riparina II em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível (ECI).

Os camundongos foram primeiramente divididos em dois grupos, “saudáveis” (que não passaram pelo protocolo de estresse) e “ECI” (que foram submetidos aos eventos estressores), os quais foram subdivididos nos grupos VEÍCULO, RIP I, RIP II e FLUOXETINA (n=10 animais por grupo):

- **Grupo 1: SAUD+VEI:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressor durante 4 semanas e administração de água destilada por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.
- **Grupo 2: SAUD+RIP I:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressor durante 4 semanas e administração de Riparina I 50 mg/Kg por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.
- **Grupo 3: SAUD+RIP II:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressor durante 4 semanas e administração de Riparina II 50 mg/Kg por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.
- **Grupo 4: SAUD+FLU:** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressor durante 4 semanas e administração de Fluoxetina 10 mg/Kg por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.
- **Grupo 5: ECI+VEI:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de água destilada por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.
- **Grupo 6: ECI+RIP I:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de Riparina I 50 mg/Kg por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.
- **Grupo 7: ECI+RIP II:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de Riparina II 50 mg/Kg por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.
- **Grupo 8: ECI+FLU:** animais foram submetidos a fatores estressores durante 28 dias e administração de Fluoxetina 10 mg/Kg por via oral (v.o.) do 15º ao 28º dia.

Durante 28 dias, os animais foram expostos a fatores estressores e a partir do 15º dia do início do protocolo, tempo necessário para o animal desenvolver comportamentos depressão-símile, iniciaram-se os tratamentos em todos os grupos, uma vez ao dia. Os grupos ECI receberam as drogas 30 minutos antes da aplicação diária do estresse. No mesmo momento do dia, os animais saudáveis receberam iguais tratamentos (veículo, RIP I, RIP II ou FLU). No 29º dia, todos os animais foram submetidos a testes comportamentais, conforme descrito abaixo. O delineamento do experimento está representado na Figura 8.

Figura 8 – Representação esquemática do protocolo experimental



Fonte: elaborada pela autora.

4.4 Protocolo de indução de comportamento depressivo-símile por estresse crônico imprevisível (ECI)

O protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) foi conduzido como previamente descrito na literatura com modificações (GARZA et al., 2012; GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2014; WILLNER, 1997, 1997). Para tanto, os animais submetidos ao ECI foram expostos a eventos estressores randomicamente organizados, durante 28 dias, de modo que cada evento foi aplicado uma vez a cada semana. 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 no Quadro 1.

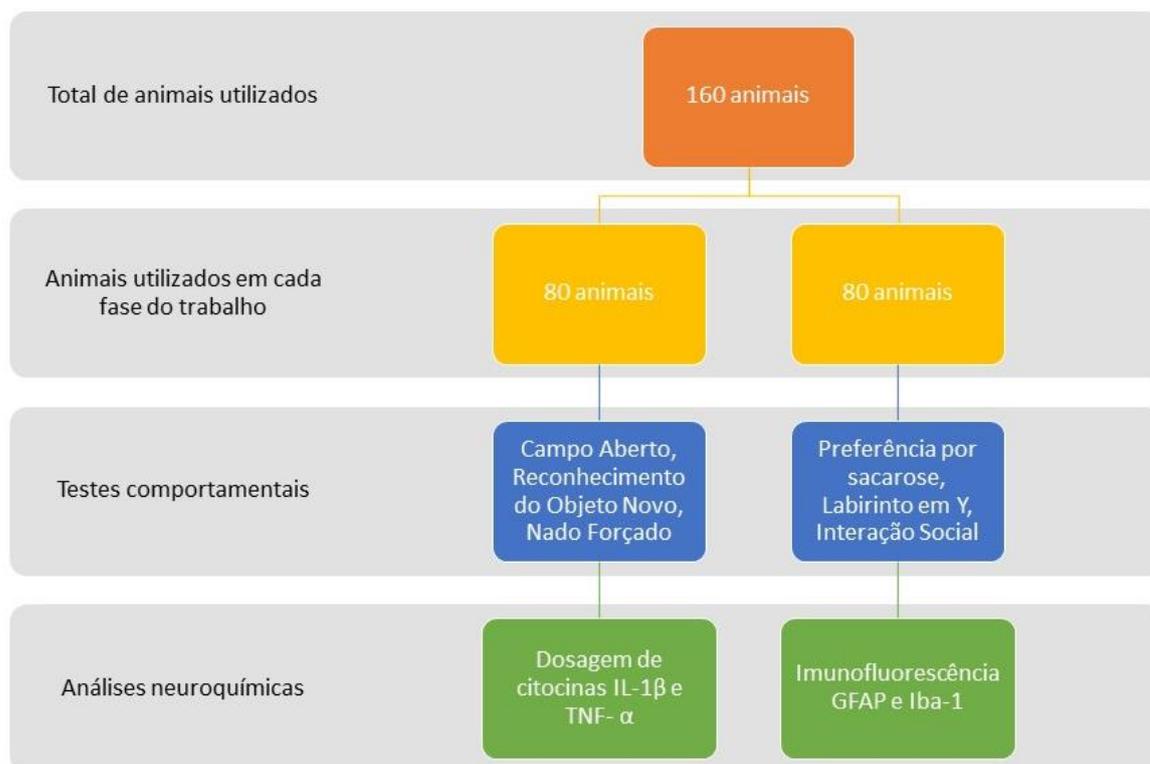
Quadro 1 – Eventos estressores aplicados durante o protocolo de ECI

DIA DO EXPERIMENTO	EVENTO ESTRESSOR	DURAÇÃO
1	Ciclo claro	24 horas
2	Contenção em tubo	2 horas
3	Choque nas patas (1mA)	2 segundos
4	Privação de água	18 horas
5	Ciclo intermitente	24 horas
6	Inclinação da caixa	8 horas
7	Contenção em tubo	2 horas
8	Ciclo claro	24 horas
9	Choque nas patas (1mA)	2 segundos
10	Ciclo intermitente	24 horas
11	Maravalha molhada	18 horas
12	Privação de água	18 horas
13	Contenção em tubo	2 horas
14	Ciclo intermitente	24 horas
15	Inclinação da caixa	8 horas
16	Maravalha molhada	18 horas
17	Privação de água	18 horas
18	Ciclo claro	24 horas
19	Inclinação da caixa	8 horas
20	Choque nas patas (1mA)	2 segundos
21	Maravalha molhada	18 horas
22	Contenção em tubo	2 horas
23	Privação de água	18 horas
24	Ciclo claro	24 horas
25	Maravalha molhada	18 horas
26	Inclinação da caixa	8 horas
27	Choque nas patas (1mA)	2 segundos
28	Ciclo intermitente	24 horas

Fonte: elaborado pela autora.

Para a condução do protocolo experimental, foram utilizados 160 animais, distribuídos conforme apresentado na Figura 9, com a finalidade de evitar vieses decorrentes da avaliação comportamental extensiva.

Figura 9 – Distribuição dos animais utilizados no protocolo experimental



Fonte: elaborada pela autora.

4.5 Testes Comportamentais

4.5.1 *Campo Aberto*

O teste do campo aberto foi realizado utilizando-se um aparato de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm; dividido em 9 quadrantes iguais), com o objetivo de avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Foram investigados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos, número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e número de explorações verticais (*rearing*), registrados durante um tempo de 5 minutos, após 1 minuto de habituação.

4.5.2 *Nado Forçado*

O teste do Nado Forçado foi realizado de acordo com o modelo de Porsolt *et al.*, (1977). Os animais foram colocados no cilindro com água, e a duração total da imobilidade (em segundos) foi registrada durante um tempo de 5 minutos, após 1 minuto de adaptação,

por um observador cego ao tratamento dado a cada animal. O camundongo foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando passivamente, podendo fazer leves movimentos para manter a cabeça fora da água.

4.5.3 Preferência por sacarose

O teste de preferência pela solução de sacarose foi realizado como descrito previamente (LOPES *et al.*, 2018; WILLNER *et al.*, 1987). Antes do teste, no vigésimo sexto dia do protocolo, houve a adaptação, período em que os camundongos foram expostos a dois frascos de uma solução de sacarose (2%, v/v), durante 18 horas; em seguida, no vigésimo sétimo dia do protocolo, uma das garrafas foi substituída por água durante 18 horas. Após a adaptação, no vigésimo oitavo dia do protocolo, para a realização do teste, os animais foram colocados em gaiolas individuais e receberam a opção de uma garrafa contendo 100 mL de água e outra contendo 100 mL de sacarose (2%, v/v), durante 18 horas. O teste foi realizado no período da noite com privação de comida. No vigésimo nono dia do protocolo, foram determinados o consumo de água e a porcentagem de preferência pela solução de sacarose a qual foi calculada pela seguinte fórmula:

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

4.5.4 Interação Social

Para a realização do teste, os animais foram colocados no aparato constituído por três compartimentos. Em um dos compartimentos laterais havia uma gaiola contendo um animal da mesma espécie, sexo e idade, enquanto no outro compartimento lateral havia uma gaiola vazia. A avaliação ocorreu por 5 minutos, durante os quais se observou o tempo de permanência do animal em cada um dos compartimentos (MOY *et al.*, 2004). A preferência social foi definida como: (% tempo gasto na câmara social) – (% tempo gasto na câmara oposta).

4.5.5 Labirinto em Y

A memória de trabalho foi avaliada por meio do teste de labirinto em Y (SARTER; BODEWITZ; STEPHENS, 1988). O labirinto consiste em três braços idênticos (A,B,C) de 40

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

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

4.5.6 Reconhecimento do Objeto Novo

O teste de reconhecimento do objeto novo avalia a memória de reconhecimento a partir da tendência inata dos roedores de explorar objetos desconhecidos. Inicialmente, os camundongos foram individualmente colocados em um aparato de campo aberto (30x30x15cm) por 5 min (fase de habituação). Após um intervalo de 15 min, o animal foi novamente colocado no aparato, no qual havia dois objetos idênticos, podendo explorá-los livremente (fase de aquisição) durante 5 min. Esses objetos eram pesados e altos o suficiente para que os animais não pudessem movê-los ou escalá-los. Após um intervalo de 15 min, ocorreu a fase de teste, na qual o animal foi colocado no mesmo ambiente, agora com um dos objetos substituído por um novo, diferente em cor, forma e tamanho, podendo livremente explorar os dois objetos durante 5 minutos. 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.

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. Um índice de reconhecimento foi calculado como a seguir: $(\text{tempo explorando o objeto novo} - \text{tempo explorando o objeto familiar}) / (\text{tempo explorando o objeto novo} + \text{tempo explorando o objeto familiar})$ (DE SOUZA *et al.*, 2019).

4.6 Testes Neuroquímicos

4.6.1 Eutanásia e obtenção do material biológico

A eutanásia dos animais ocorreu no 29º dia, após 1h da realização dos testes comportamentais.

Para a coleta das áreas cerebrais por dissecação (utilizadas na técnica de Elisa), os animais foram eutanasiados por decapitação, os cérebros retirados e o hipocampo separado em tubos e armazenados a -80°C para utilização posterior.

Para a coleta das áreas cerebrais usadas na técnica de imunofluorescência, os animais foram previamente anestesiados com mistura de cetamina e xilazina (90mg/kg e 9mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal) e perfundidos transcardiacamente com solução fisiológica 0,9% e paraformaldeído 4%. Os cérebros foram coletados e armazenados conforme protocolo explicado posteriormente.

4.6.2 Marcação de GFAP e Iba-1 por imunofluorescência

Os cérebros dos animais de cada grupo foram coletados e submersos em paraformaldeído 4% por cerca de 12 horas e posteriormente transferidos para uma solução de sacarose a 30% por 72 horas. Decorrido esse tempo, foram embebidos em gel para congelamento (Allkimia®) e armazenados a -80°C. Os cérebros foram cortados em seções coronais de 10µm, utilizando um Criostato CM1850 para cortes em congelação (Leica®) e montados em lâminas silanizadas.

Para a realização da análise, os cortes passaram pelo processo de recuperação antigênica, sendo posteriormente realizada a imunomarcção de acordo com protocolo padrão. Seções cerebrais foram incubadas com anticorpo GFAP (policlonal de cabra 1:200, Santa Cruz Biotechnology) e posteriormente, foram incubados no anticorpo secundário Alexa Fluor 488 IgG anti-cabra (1:200, Invitrogen), para marcar astrócitos, ou com o anticorpo monoclonal Iba-1 (E4O4W) XP® anti-coelho, conjugado com Alexa Fluor® 555 (1:300, Cell Signaling Technology), para marcar micróglia.

Por fim, os cortes foram marcados com 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) (SigmaAldrich, USA) por 20 minutos segundo orientações do fabricante, para marcação nuclear. As lâminas foram então montadas com solução anti-desbotamento ProlongGold (Invitrogen, USA) e fotografadas, na magnificância de 10x e de

20x em leitor de lâminas Cytation 3 ImageReader (Carl Zeiss, White Plains, NY, EUA). Os subcampos do hipocampo CA1, CA3 e GD 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.

4.6.3 Determinação dos níveis de IL-1 β e TNF- α

As áreas cerebrais foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS e centrifugadas, sendo utilizado o sobrenadante conforme o protocolo do fabricante (BioLegend, San Diego, EUA). A análise foi feita por Elisa, por meio de comparação das absorvâncias nos comprimentos de onda 450 e 570nm, e o resultado expresso por pg/g 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. os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra. Para os dados comportamentais, as análises foram realizadas por two-way ANOVA (análise de variância), usando como fatores "modelo ECI" (grupos ECI ou grupos SAUD) e "tratamento" (RIP I, RIP II, 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 alvos

A predição dos alvos biológicos de RIP I e RIP II foi realizada por meio dos servidores *Swiss Target Prediction* (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2019) e *Similarity Ensemble Approach* (SEA) (KEISER *et al.*, 2007). Por meio destes servidores é possível estimar 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 Obtenção dos ligantes e proteínas

Para determinar os modos de ligação potenciais de RIP I e RIP II com as proteínas NLRP3, ASC e P2X7, estudos de *docking* molecular foram realizados utilizando os softwares *Autodock Tools* (ADT) versão 1.5.6 e *Autodock Vina*. Ambos os softwares podem ser adquiridos gratuitamente pelo site: <http://mgtools.scripps.edu/downloads>. A estrutura cristalina de NLRP3 (PDB: 6NPY), de ASC (PDB: 2KN6) e de P2X7 (PDB: 5U1L) foram recuperadas do RSCB Protein Data Bank (endereço da web: <http://www.rcsb.org/pdb/>) e foram usadas como receptores de *docking* molecular.

Para a seleção das proteínas, foram utilizados critérios como: resolução, *R-value free*, *R-value work* e a presença de ligantes. 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 observado experimentalmente. 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.

As moléculas dos ligantes RIP I (CID: 3083797) e RIP II (CID: 18107456) foram obtidas dos bancos de dados de compostos PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

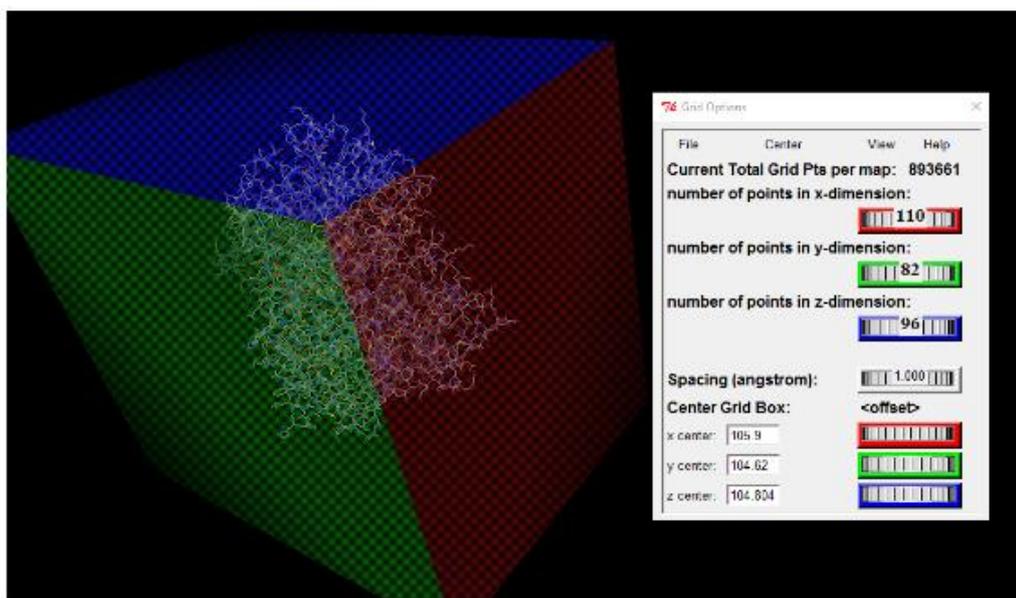
4.8.3 Preparação de ligantes e proteínas e estudos de encaixe

As estruturas dos ligantes e proteínas foram convertidas em arquivos no formato PDB, utilizando o programa *Discovery Studio* 2020. Foram removidas as moléculas de água e os ligantes co-cristalizados das proteínas. Os arquivos PDB, assim obtidos, foram convertidos posteriormente para o formato PDBQT utilizando ADT versão 1.5.6. Usando ADT, todos os átomos de hidrogênio polares foram adicionados às proteínas. As cargas de Gasteiger foram adicionadas a cada átomo e os átomos de hidrogênio não polares foram dissolvidos com a estrutura da proteína. Todas as estruturas foram salvas em arquivos PDBQT para posterior avaliação usando ADT.

Os cálculos GRID foram realizados usando um espaçamento de grade de 1,000 Å. Para proteína NLRP3 (PDB: 6NPY), o parâmetro de grade foi 110 x 82 x 96 Å com centro de grade definido como 105.9 x, 104.62 y, 104.804 z Å (Figura 10). Para a proteína ASC (PDB:

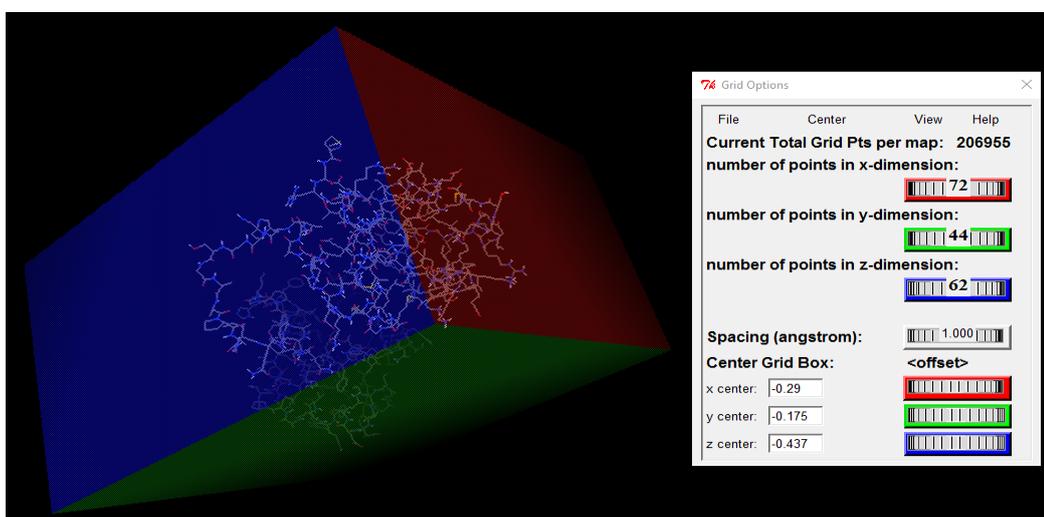
2KN6), o parâmetro de grade foi 72 x 44 x 62 Å com centro de grade definido como -0.29 x, -0.175 y, -0.437 z Å (Figura 11). Para proteína P2X7 (PDB: 5U1L), o parâmetro de grade foi 74 x 62 x 84 Å com centro de grade definido como -34.484 x, -43.414 y, 34.144 z Å (Figura 12).

Figura 10 – Estudo de encaixe para docking molecular da proteína NLRP3 (PDB: 6NPY) pelo Autodocktools versão 1.5.6.



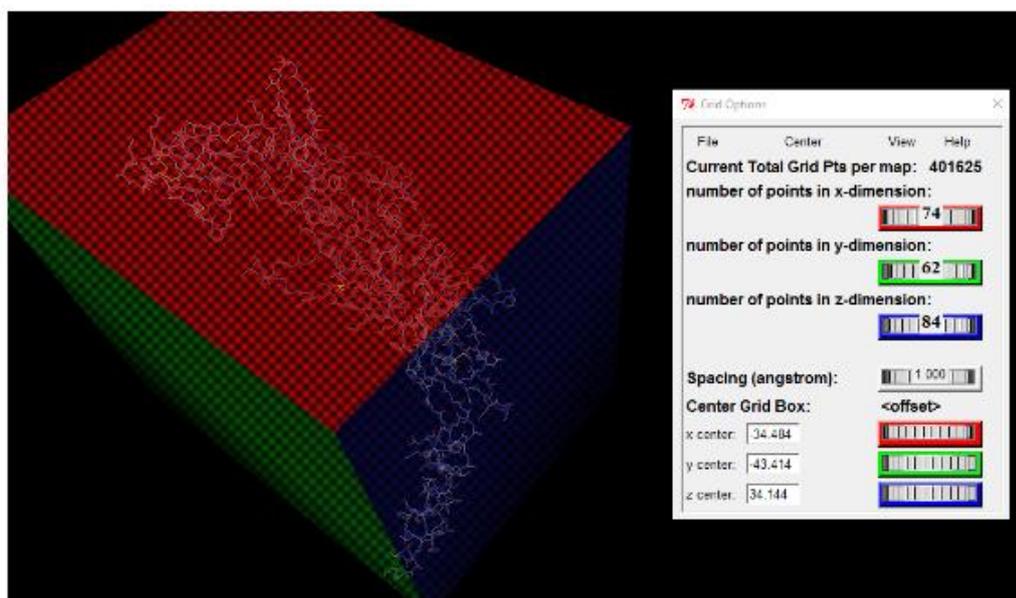
Fonte: elaborado pela autora.

Figura 11 – Estudo de encaixe para docking molecular da proteína ASC (PDB: 2KN6) pelo Autodocktools versão 1.5.6.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 12 – Estudo de encaixe para docking molecular da proteína P2X7 (PDB: 5U1L) pelo Autodocktools versão 1.5.6.



Fonte: elaborado pela autora.

4.8.4 Docking molecular

O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) foi usado no AutoDock 1.5.6 para cálculos de acoplamento flexível de ligante fixo em receptor. Para cada acoplamento proteína-ligante, um máximo de 10 poses de ligação foram geradas, e a pose mais adequada foi escolhida com base na interação dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo com o ligante. Uma vez que os complexos proteína-ligante acoplados foram concluídos, uma análise dos locais de ligação foi realizada a fim de criar um diagrama da interação 2D e projeções 3D para cada composto. A visualização e a análise do complexo acoplado de proteínas e ligantes foram feitas por meio do software Discovery Studio Visualizer 2020. Os valores de *Root Mean Square Deviation* (RMSD) foram avaliados dentro do parâmetro ideal, inferior a 2 Å (YUSUF *et al.*, 2008). A afinidade foi medida pela energia livre de Gibbs (ΔG), considerando reações exergônicas cuja liberação de energia seja maior que 6,0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014).

4.8.5 Predição Farmacocinética

RIP I e RIP II foram submetidas a uma triagem *in silico* ADME usando o banco de dados do servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>). A coleção ADME

fornece componentes que calculam as propriedades previstas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção para coleções de compostos testados (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; DAINA; ZOETE, 2016). As análises foram baseadas em propriedades físico-químicas, como estimativa de absorção intestinal humana (HIA) e barreira hematoencefálica (BBB), permeabilidade pelo método Brain Or IntestinaL EstimateD permeation (BOILED-Egg), bem como estimativa de permeabilidade passiva (Papp), efluxo passivo por P-gp e inibição de isoformas enzimáticas do citocromo P450 (CYP450). Para avaliar a permeabilidade de RIP I e RIP II sobre as membranas plasmáticas foram adotadas as regras dos 5 de Lipinski *et al.*, (2001).

5 RESULTADOS

5.1 Testes Comportamentais

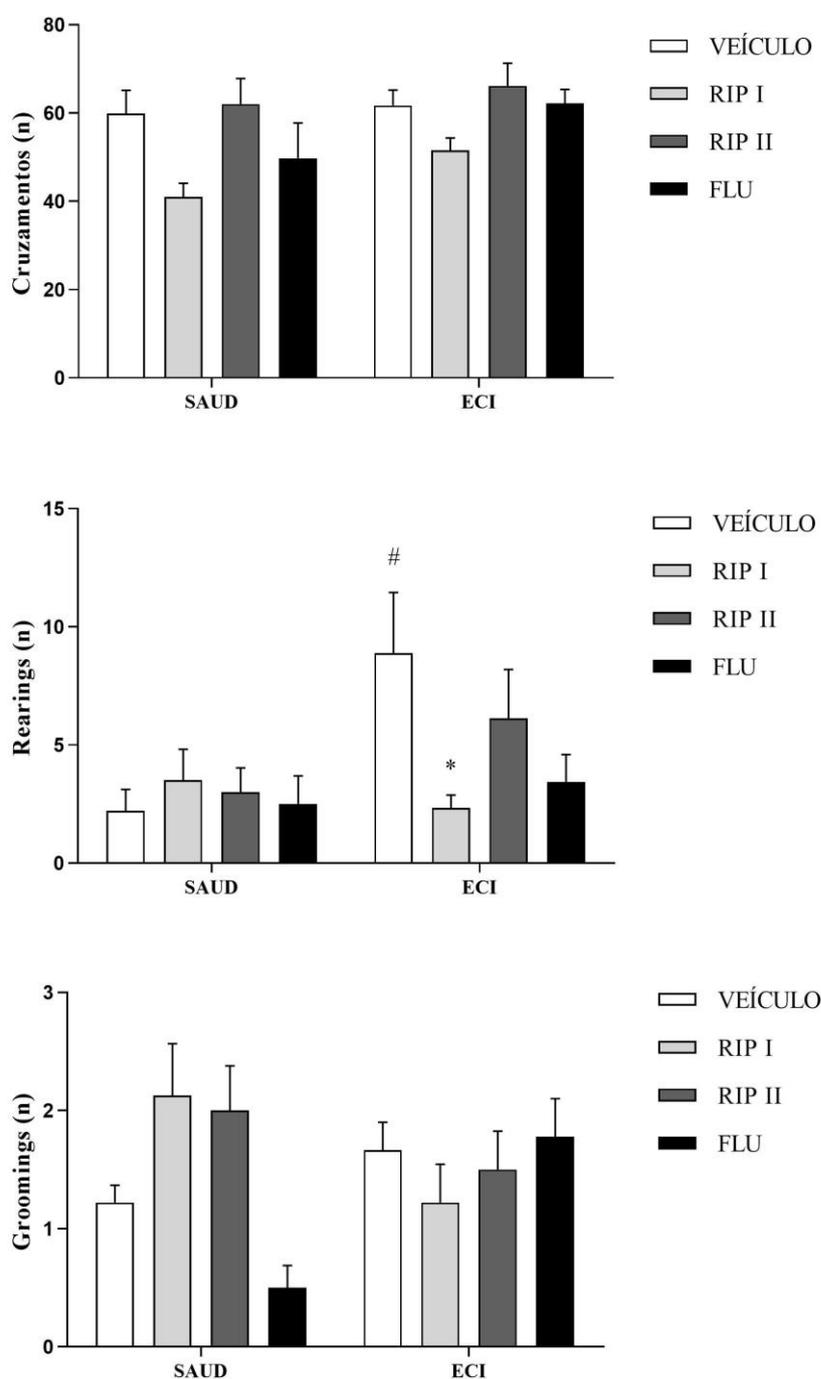
5.1.1 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI

No teste do campo aberto, foram avaliados os parâmetros cruzamentos, *rearings* e *groomings*. Não houve diferença no número de cruzamentos entre os grupos avaliados, mostrando que o modelo ECI e o tratamento com RIP I ou RIP II não alteraram a atividade locomotora dos animais (Figura 13).

Quanto ao número de *rearings*, a análise revelou uma diferença entre os grupos [F (3, 60) = 3,107; p = 0,0330], visto que houve aumento significativo neste parâmetro no grupo ECI + VEI em comparação ao grupo controle (SAUD + VEI) (p=0,0412). O grupo tratado com RIP I apresentou reversão nessa alteração (p=0,0357).

No parâmetro número de *groomings*, também não houve diferença entre os grupos.

Figura 13 – Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a atividade locomotora e comportamentos ansiedade-símile no teste do campo aberto em camundongos submetidos ao ECI

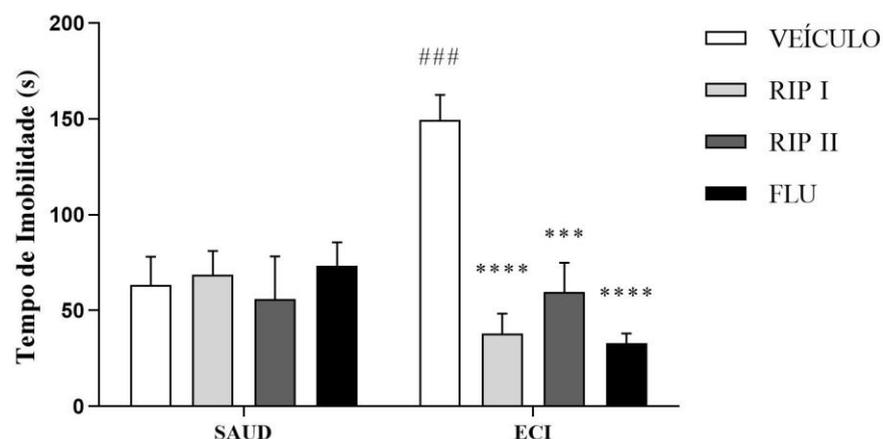


Os resultados são expressos como a média±EPM (n=8-10animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: #p < 0,05 vs SAUD+VEI, *p < 0,05 vs ECI+VEI (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina; FLU – fluoxetina).

5.1.2 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 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, 61) = 9,489; p <0,0001] entre os fatores “modelo ECI” e “tratamento”. O ECI aumentou o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle saudável (p<0,001). Como mostrado na Figura 14, o tratamento com RIP I (p<0,0001) ou RIP II (p=0,0004) foi capaz de reduzi-lo, em 74% e 60% respectivamente, em comparação ao grupo estressado que não recebeu tratamento, enquanto FLU reduziu em 78%.

Figura 14 – Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos submetidos ao ECI



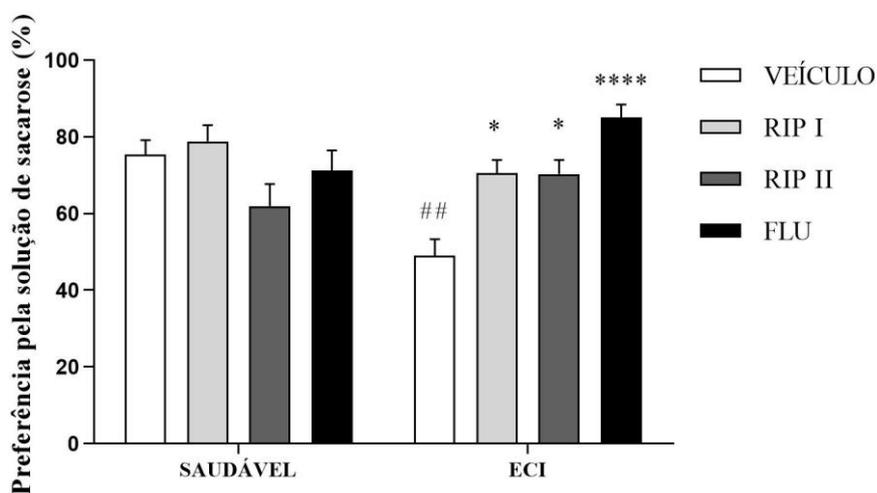
Os resultados são expressos como a média±EPM (n=8-10animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ###p <0,001 vs SAUD+VEI, ***p<0,001 e ****p<0,0001 vs ECI+VEI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina; FLU – fluoxetina)

5.1.3 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência pela solução de sacarose em camundongos submetidos ao ECI

Na avaliação do comportamento tipo anedônico (Figura 15), ECI diminuiu significativamente (p<0,0012) a preferência dos animais pela solução de sacarose quando em comparação ao grupo controle (SAUD+VEI), enquanto o tratamento com RIP I ou RIP II foi capaz de recuperar a preferência de sacarose em animais expostos ao estresse (p<0,05). A

interação entre os fatores foi significativa [F (3, 56) = 9,081; p <0,0001].

Figura 15 – Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência pela solução de sacarose em camundongos submetidos ao ECI

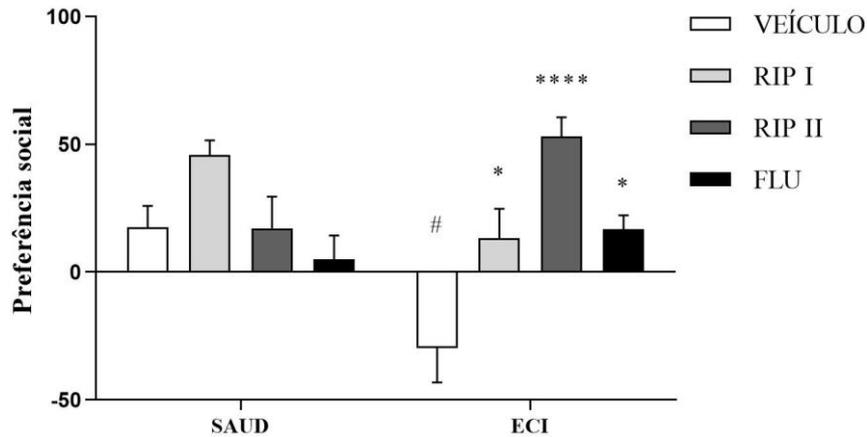


Os resultados são expressos como a média±EPM (n=7-9animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ##p <0,01 vs SAUD+VEI, *p<0,05 e ****p<0,0001 vs ECI+VEI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina; FLU – fluoxetina)

5.1.4 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência social no teste de interação social em camundongos submetidos ao ECI

Na avaliação do parâmetro de preferência social (Figura 16), houve significativa interação entre os fatores [F (3, 54) = 7,724; p=0,0002]. O grupo submetido ao ECI teve menor interação com o animal estranho comparado ao grupo controle (SAUD+VEI) enquanto os animais estressados que foram tratados com RIP I ou RIP II apresentaram melhor índice de preferência social.

Figura 16 – Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a preferência social no teste de interação social em camundongos submetidos ao ECI

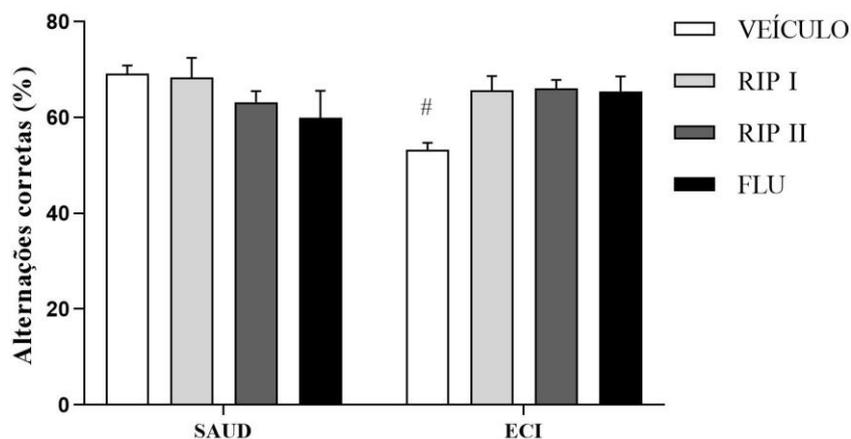


Os resultados são expressos como a média±EPM (n=7-9animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: #p <0,05 vs SAUD+VEI, *p<0,05 e ****p<0,0001 vs ECI+VEI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina; FLU – fluoxetina)

5.1.5 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a porcentagem de alterações corretas no teste do labirinto em Y em camundongos submetidos ao ECI

Com relação ao parâmetro analisado, número de alterações corretas (Figura 17), percebeu-se um prejuízo na resposta cognitiva dos animais estressados (ECI+VEI) em relação aos animais não estressados (SAUD+VEI) (p=0,0137). A análise por two-way ANOVA demonstrou uma interação significativa [F (3, 54) = 4,674, p=0,0056] entre os fatores “modelo ECI” e “tratamento”. O tratamento com RIP I ou RIP II aumentou esse índice em 23% e 24%, respectivamente, resultados não considerados significativos.

Figura 17 - Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre a porcentagem de alterações corretas no teste do labirinto em Y em camundongos submetidos ao ECI

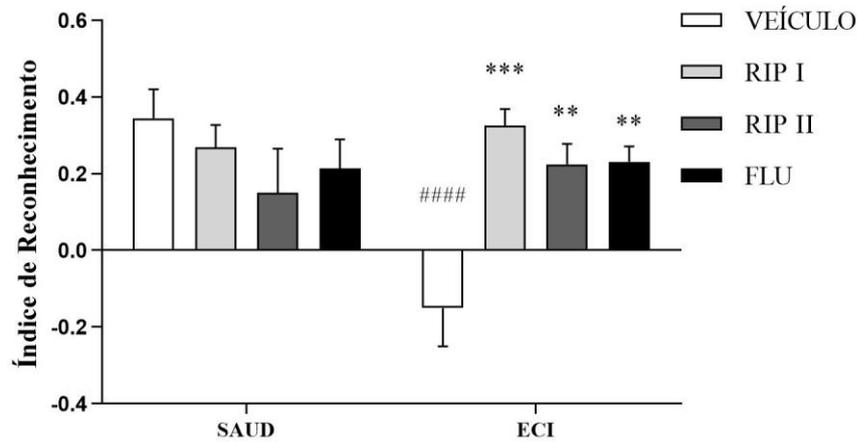


Os resultados são expressos como a média±EPM (n=7-9animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: #p <0,05 vs SAUD+VEI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina; FLU – fluoxetina).

5.1.6 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento no teste do reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI

Com relação à memória episódica (Figura 18), observou-se que o ECI também causou prejuízo, visto pela redução do índice de reconhecimento (p=0,0003), comparando-se ao grupo controle (SAUD+VEI). Além disso, os grupos submetidos ao ECI tratados com RIP I ou RIP II apresentarem resultados melhores quando comparados aos não tratados [F (3, 62) = 7,633, p=0,0002] com aumento de 317% e 250% no índice de reconhecimento, respectivamente.

Figura 18 – Efeito da administração de RIP I e RIP II (50 mg/kg) sobre o índice de reconhecimento no teste do reconhecimento do objeto novo em camundongos submetidos ao ECI



Os resultados são expressos como a média±EPM (n=8-10animais/grupo). A análise estatística foi determinada por two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: #####p<0,0001 vs SAUD+VEI, ***p<0,001 e **p<0,01 vs ECI+VEI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina; FLU – fluoxetina).

5.2 Testes Neuroquímicos

5.2.1 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de GFAP em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI

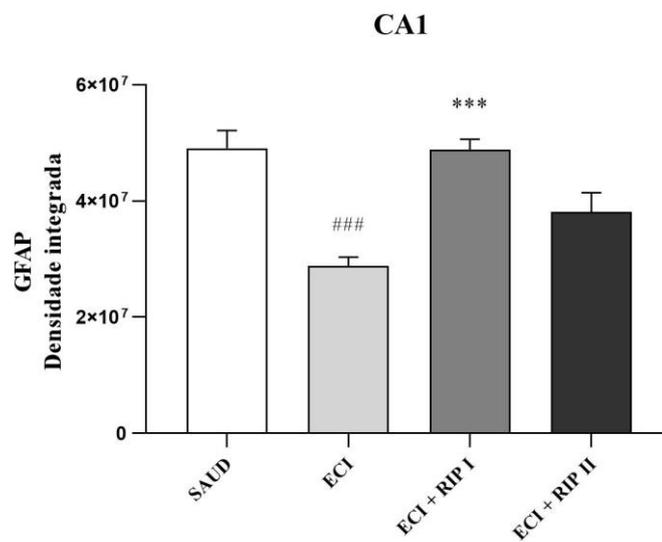
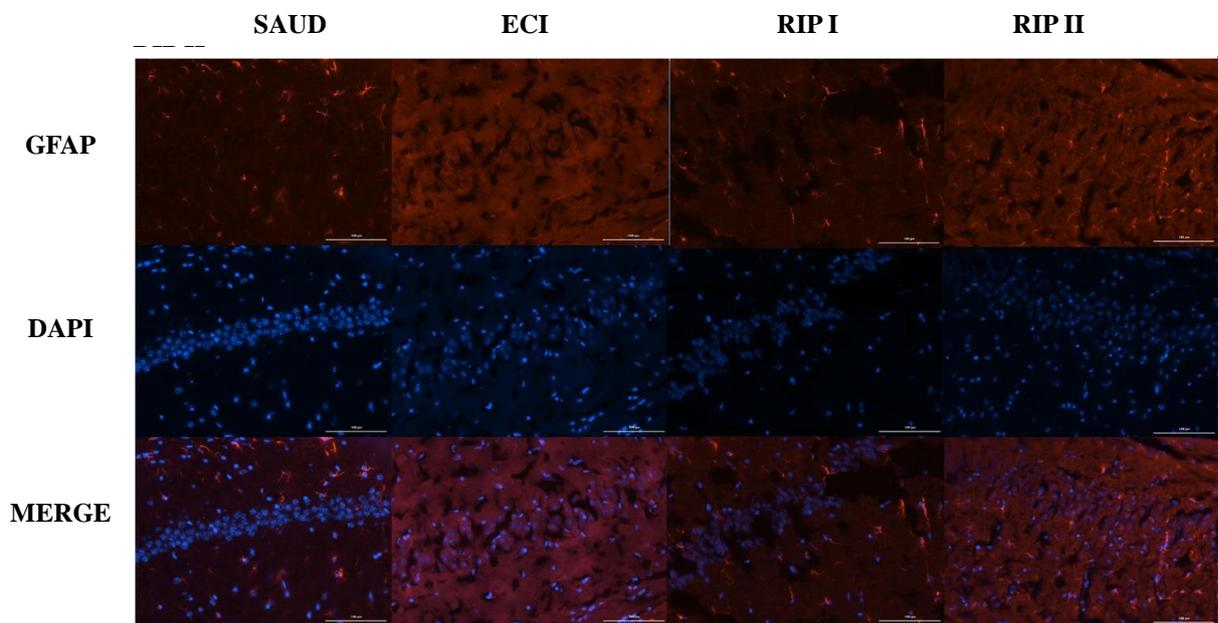
A ativação astrocítica foi avaliada com o marcador GFAP nos subcampos CA1, CA3 e GD do hipocampo (Figura 19 – A, B e C). Na área CA1, a expressão de GFAP foi reduzida no grupo ECI em relação ao controle (SAUD) (p=0,0002) e o tratamento com RIP I foi capaz de reverter esta redução (p=0,0002) [F (3, 16) = 14,74, p<0,0001]. RIP II não apresentou resultado significativo, apesar de aumentar em 32% a expressão de GFAP, em comparação ao grupo ECI.

Na área CA3, ECI diminuiu a expressão de GFAP [F (3, 16) = 10,51, p=0,0005] em relação ao grupo não estressado (p=0,0003). RIP I e RIP II aumentaram em 43% e 22%, respectivamente a expressão de GFAP em comparação ao grupo ECI, porém esse não foi considerado um aumento significativo.

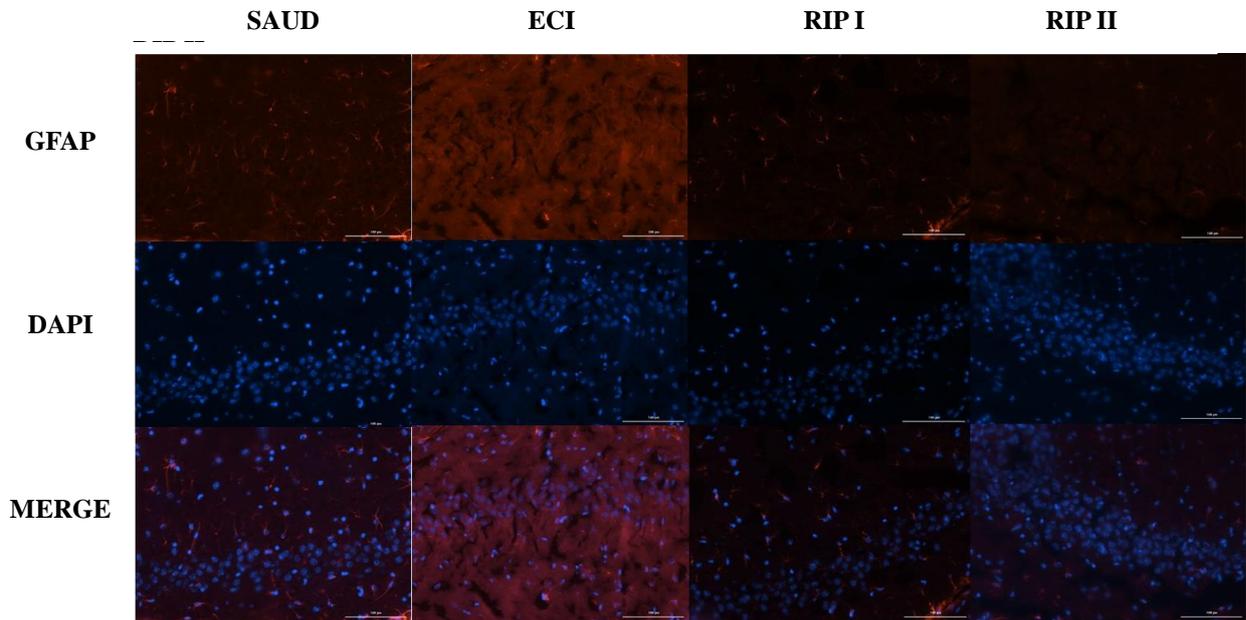
Quanto ao subcampo GD, o estresse crônico também reduziu ($p < 0,0080$) a expressão de GFAP [$F(3, 16) = 6,657$, $p = 0,0040$], a qual foi significativamente aumentada pelo tratamento com RIP I ($p = 0,0119$). Quanto ao tratamento com RIP II, o aumento causado foi de 22% em relação ao grupo ECI, embora essa diferença não seja significativa.

Figura 19 - Efeito da administração de RIP I ou RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de GFAP em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI

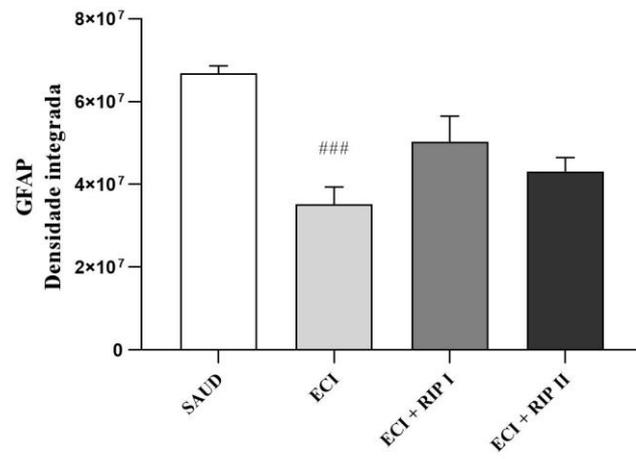
A. CA1



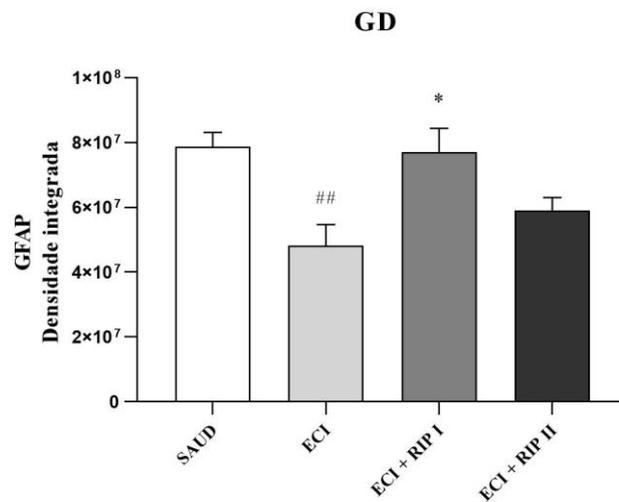
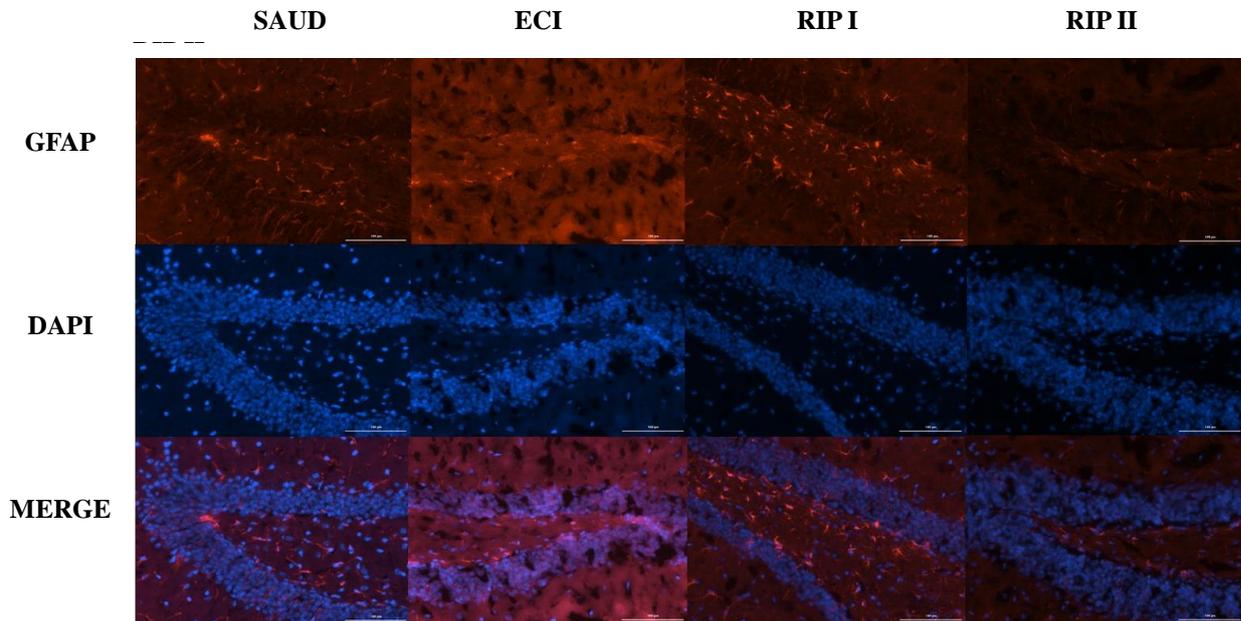
B. CA3



CA3



C. GD



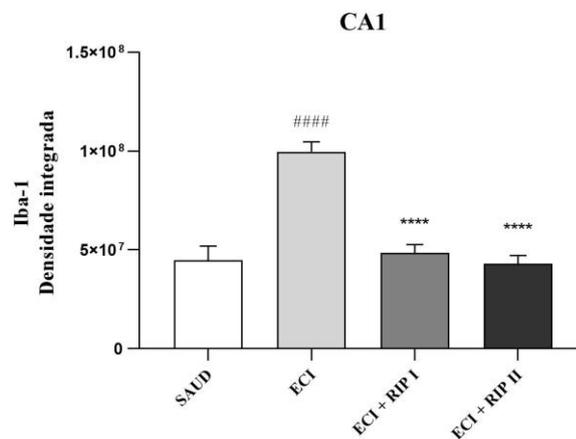
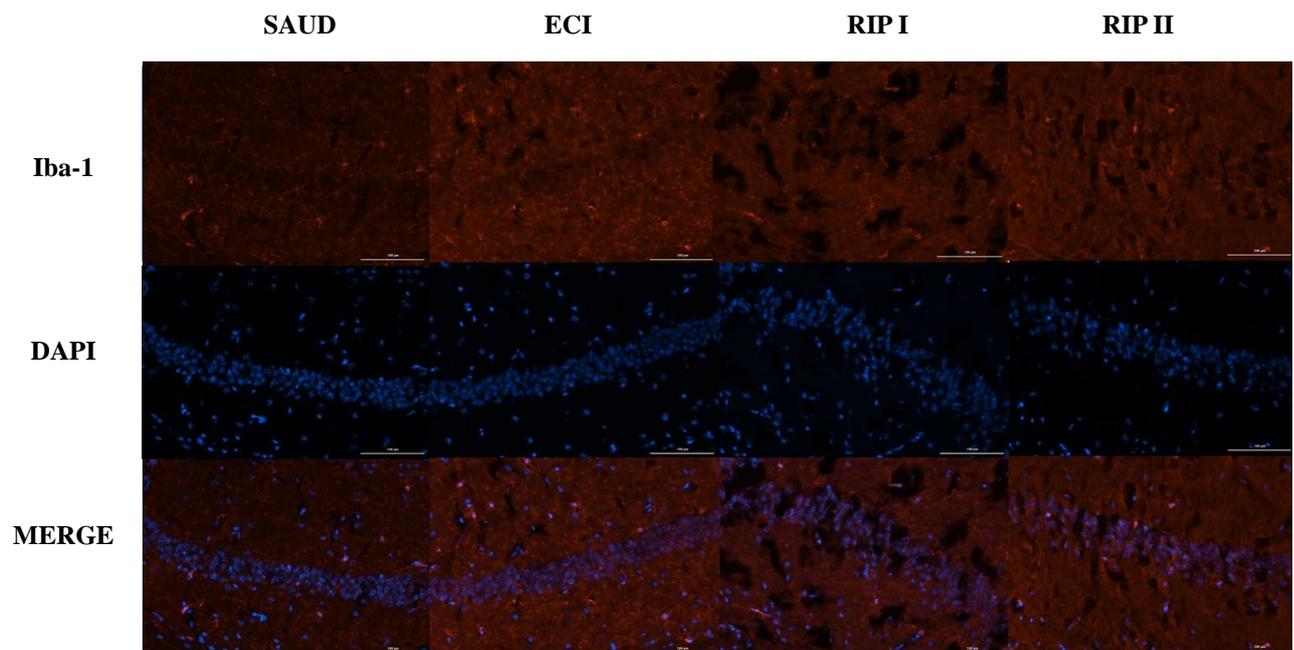
Acima, fotomicrografias representativas do hipocampo *Cornu Ammonis* (CA) subcampos CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (GD) (C) mostrando células coradas apenas para GFAP (em vermelho); núcleos corados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (em azul) e mistura da coloração de GFAP e DAPI (merge). Abaixo, a quantificação refere-se à densidade integrada de fluorescência nas respectivas subáreas do hipocampo. Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 5 animais/grupo). A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ###p <0,001 e ##p <0,01 vs SAUD; *p<0,05 e ***p<0,001 vs ECI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina).

5.2.2 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de Iba-1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI

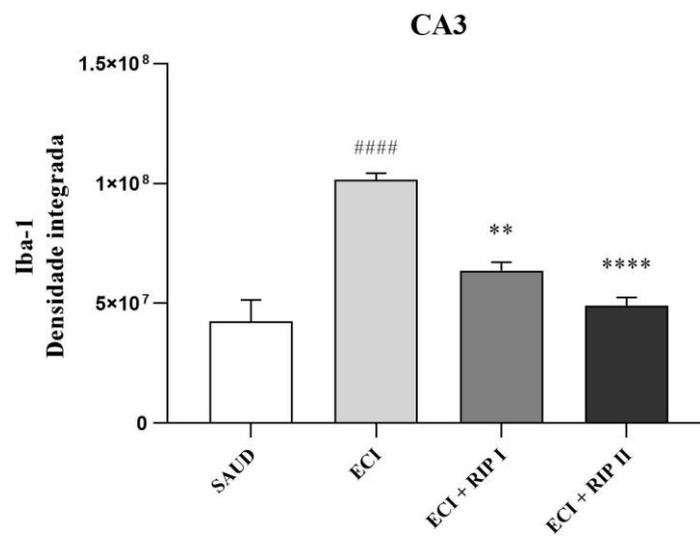
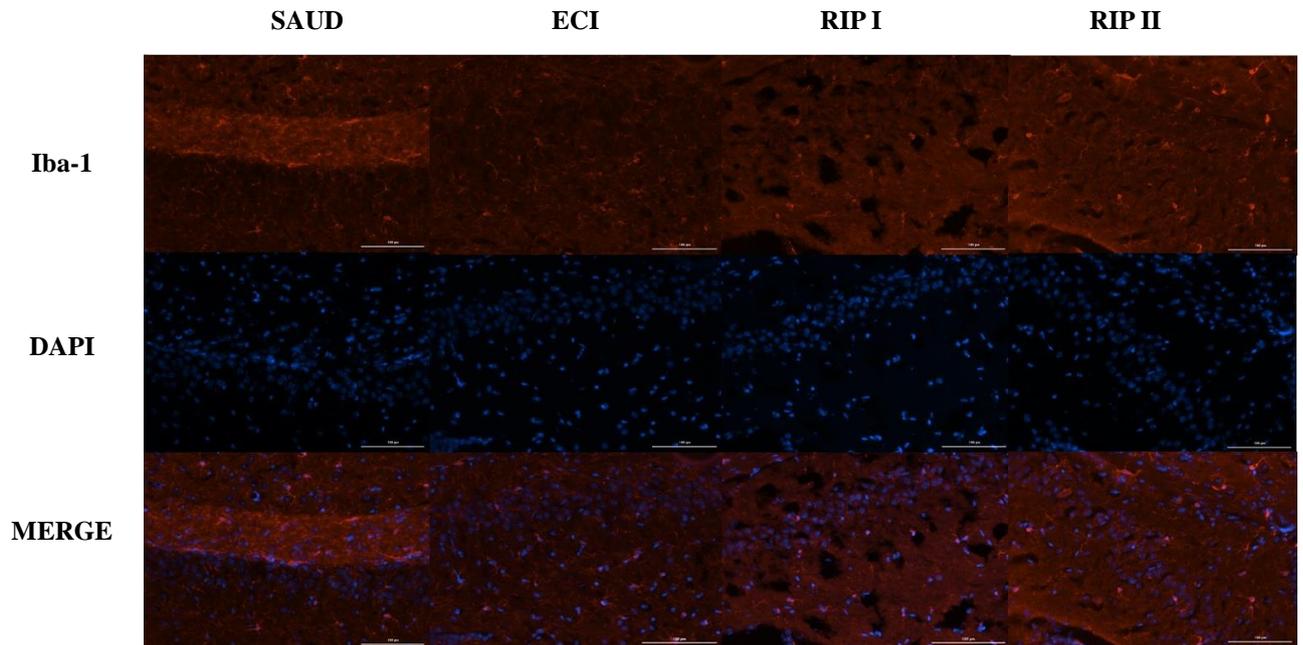
A ativação microglial foi avaliada com o marcador Iba-1 nos subcampos CA1, CA3 e GD do hipocampo (Figura 20 - A, B e C). Nas três áreas analisadas, ECI aumentou a expressão de Iba-1 em relação ao grupo não estressado ($p < 0,0001$). O tratamento com RIP I ($p < 0,0001$), bem como RIP II ($p < 0,0001$), foi capaz de reverter esse aumento. CA1: [F (3, 18) = 28,54, $p < 0,0001$]; CA3: [F (3, 14) = 23,60, $p = 0,0001$]; GD: [F (3, 16) = 67,58, $p = 0,0001$].

Figura 20 - Efeito da administração de RIP I OU RIP II (50mg/kg) sobre a expressão de Iba-1 em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.

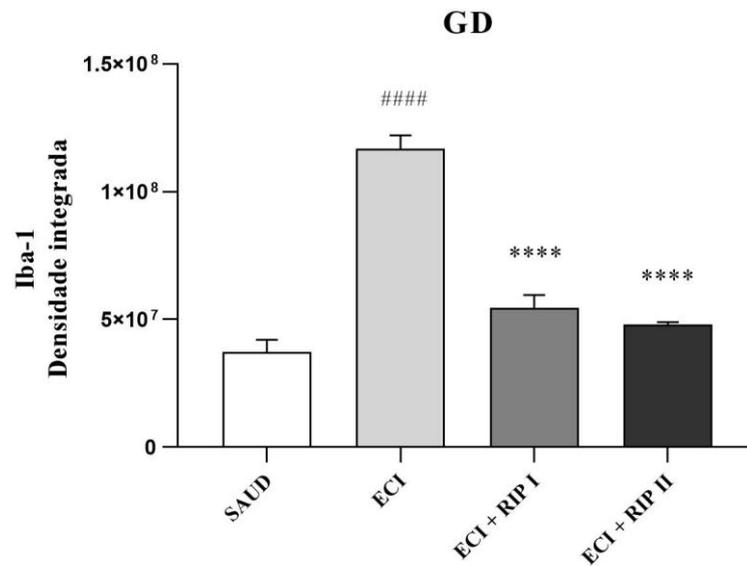
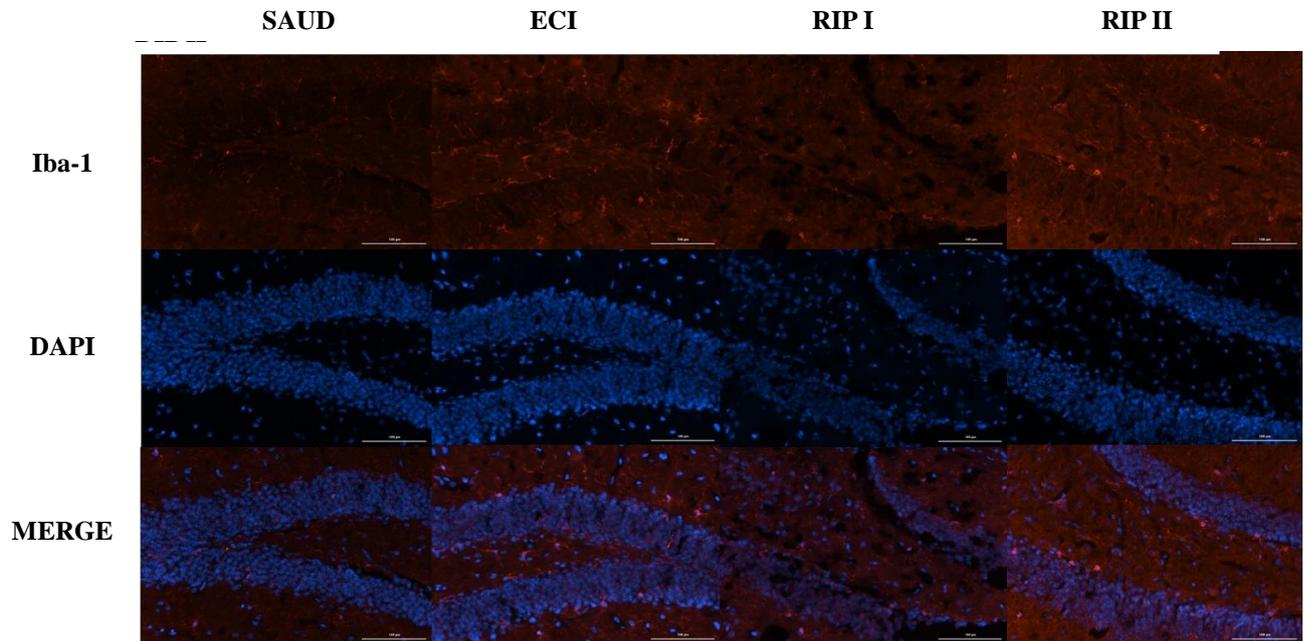
A. CA1



B. CA3



C. GD

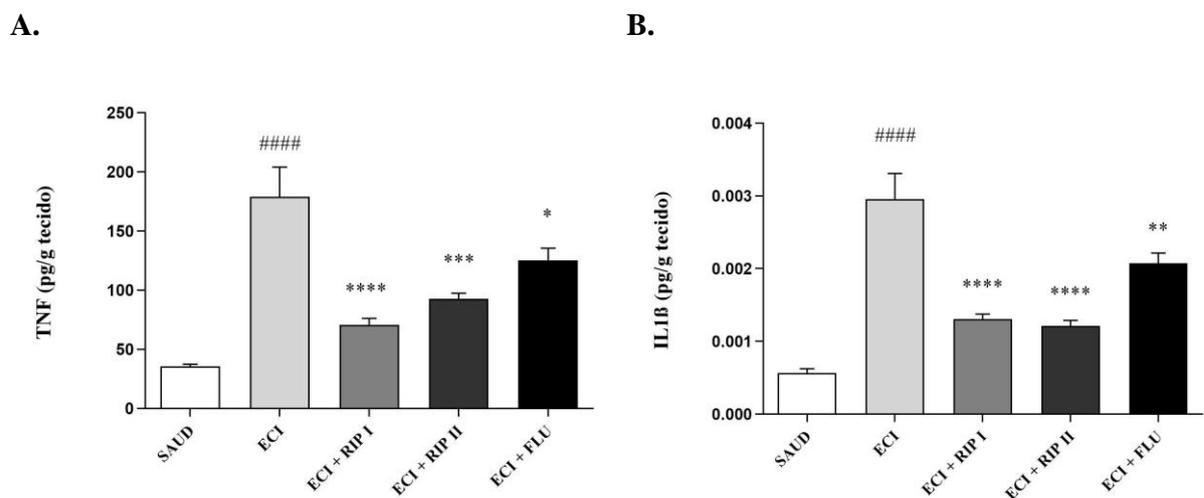


Acima, fotomicrografias representativas do hipocampo *Cornu Ammonis*(CA) subcampos CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (GD) (C) mostrando células coradas apenas para Iba-1 (em vermelho); núcleos corados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (em azul) e mistura da coloração de Iba-1 e DAPI (merge). Abaixo, a quantificação refere-se à densidade integrada de fluorescência nas respectivas subáreas do hipocampo. Os resultados são expressos como a média±EPM (n= 5-6 animais/grupo). A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ####p <0,0001 vs SAUD; **p<0,01 e ****p<0,0001 vs ECI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina)

5.2.3 Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a concentração de TNF- α e IL-1 β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI

Os níveis de TNF- α no hipocampo foram aumentados ($p < 0,0001$) com a exposição ao ECI [F (4, 34) = 18,28, $p < 0,0001$], em comparação ao grupo saudável e o tratamento com RIP I ($p < 0,0001$) ou RIP II ($p < 0,001$) foi capaz de reverter esse aumento, como visto na Figura 21 (A). De forma semelhante, ECI aumentou os níveis de IL-1 β em comparação ao grupo controle (SAUD) ($p < 0,0001$). Os animais tratados com RIP I ($p < 0,0001$) e RIP II ($p < 0,0001$) apresentaram menores níveis de IL-1 β , como representado na Figura 21 (B), quando comparados com o grupo estressado que não recebeu tratamento [F (4, 34) = 30,04, $p < 0,0001$].

Figura 21 – Efeito da administração de RIP I e RIP II (50mg/kg) sobre a concentração de TNF- α e IL-1 β em hipocampo de camundongos submetidos ao ECI.



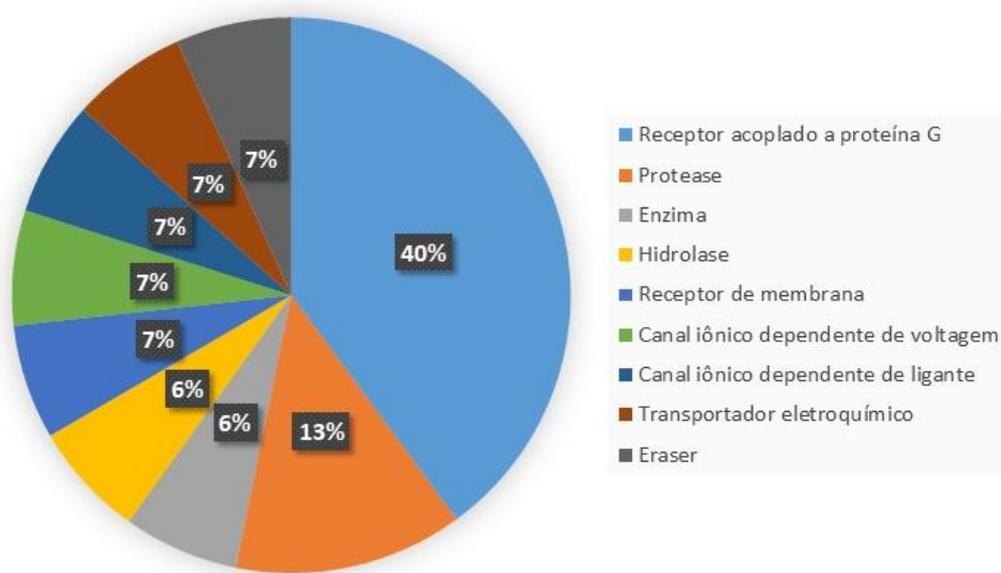
Os resultados são expressos como a média \pm EPM (n= 8 animais/grupo). A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Valores significativos: ##### $p < 0,0001$ vs SAUD; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ vs ECI. (Abreviaturas: SAUD – saudável; ECI – estresse crônico imprevisível; RIP – riparina; FLU – fluoxetina).

5.3 Testes *in silico*

5.3.1 Predição de alvos

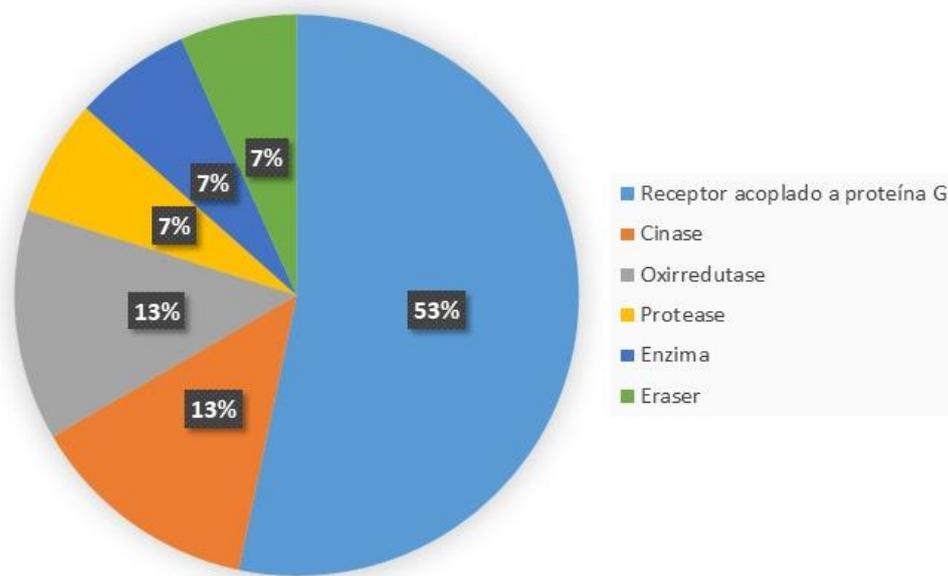
Para estimar os alvos humanos mais prováveis para os efeitos anti-neuroinflamatórios de RIP I e RIP II, as estruturas químicas foram submetidas aos servidores *Swiss Target Prediction* e *Similarity Ensemble Approach*, os quais apresentaram os alvos proteicos mais prováveis de ligação com RIP I e RIP II, com base na similaridade desta com as estruturas químicas do banco de dados de compostos ChemMBL. Os Gráficos 1 e 2 mostram as classes das proteínas mais prováveis de ligação. Para ambas as moléculas, a maioria dos alvos prováveis de ligação são receptores acoplados a proteína G, além de proteases e canais iônicos ativados por ligante ou por voltagem.

Gráfico 1 – Representação das classes das 15 principais proteínas prováveis às quais RIP I pode se ligar para exercer seu efeito com base nos dados obtidos do servidor *Swiss Target Prediction*



Fonte: obtido do servidor *Swiss Target Prediction*

Gráfico 2 - Representação das classes das 15 principais proteínas prováveis às quais RIP II pode se ligar para exercer seu efeito com base nos dados obtidos do servidor *Swiss Target Prediction*



Fonte: obtido do servidor *Swiss Target Prediction*

A seguir, são apresentados nas Tabelas 1 e 2 os principais alvos protéicos com sua respectiva probabilidade para RIP I (A) e RIP II (B), obtidos dos servidores *Swiss Target Prediction* e *Similarity Ensemble Approach*.

Tabela 1 (A) - Prováveis alvos de ligação de RIP I obtidos do servidor *Swiss Target Prediction*

Alvo	Nome comum	Probabilidade	Ativos conhecidos (3D/2D)
Quinone reductase 2	NQO2	0,567787772	86 / 31
Mu opioid receptor	OPRM1	0,151315357	99 / 422
Kappa Opioid receptor	OPRK1	0,143473412	90 / 229
Delta opioid receptor	OPRD1	0,135616203	106 / 430
Melatonin receptor 1A	MTNR1A	0,127750341	656 / 294
Melatonin receptor 1B	MTNR1B	0,127750341	590 / 251
Serotonin 2c (5-HT2c) receptor	HTR2C	0,127750341	344 / 114
P2X purinoceptor 7	P2RX7	0,119895127	602 / 36
Acetylcholinesterase	ACHE	0,119895127	323 / 292
Glycine transporter 2	SLC6A5	0,112041901	7 / 72
Sigma opioid receptor	SIGMAR1	0,112041901	52 / 318
Vanilloid receptor	TRPV1	0,112041901	552 / 69
Histone deacetylase 2	HDAC2	0,112041901	144 / 9
Cannabinoid receptor 2	CNR2	0,112041901	1151 / 105
Histone deacetylase 6	HDAC6	0,112041901	164 / 40
Monoamine oxidase B	MAOB	0,112041901	783 / 67
Dopamine D4 receptor	DRD4	0,112041901	285 / 172
Dopamine D3 receptor	DRD3	0,112041901	232 / 337
Monoamine oxidase A	MAOA	0,112041901	377 / 39
Serotonin 2a (5-HT2a) receptor (by homology)	HTR2A	0,112041901	423 / 232
Dopamine D1 receptor	DRD1	0,112041901	148 / 71
Tyrosine-protein kinase JAK3	JAK3	0,112041901	474 / 0
Tyrosine-protein kinase JAK1	JAK1	0,112041901	401 / 0
Estrogen receptor beta	ESR2	0,112041901	150 / 19
Tyrosine-protein kinase SYK	SYK	0,112041901	459 / 1
Phosphodiesterase 9A	PDE9A	0,112041901	45 / 0
Serotonin 2b (5-HT2b) receptor	HTR2B	0,112041901	114 / 105
Norepinephrine transporter	SLC6A2	0,112041901	35 / 166
CREB-binding protein/p53	CREBBP	0,112041901	92 / 0
P2X purinoceptor 3	P2RX3	0,112041901	51 / 0
Metabotropic glutamate receptor 1	GRM1	0,112041901	136 / 0
Dopamine D2 receptor	DRD2	0,112041901	496 / 598
Mineralocorticoid receptor	NR3C2	0,112041901	188 / 0

Fonte: obtido do servidor *Swiss Target Prediction*

Tabela 1 (B) - Prováveis alvos de ligação de RIP II obtidos do servidor *Swiss Target Prediction*

Alvo	Nome comum	Probabilidade	Ativos conhecidos (3D/2D)
Quinone reductase 2	NQO2	0,231637185	70 / 19
Melatonin receptor 1A	MTNR1A	0,108770969	440 / 250
Melatonin receptor 1B	MTNR1B	0,108770969	401 / 210
Delta opioid receptor	OPRD1	0,100578902	113 / 359
Kappa Opioid receptor	OPRK1	0,100578902	122 / 173
Mu opioid receptor	OPRM1	0,100578902	129 / 323
Dopamine D1 receptor	DRD1	0,100578902	165 / 61
Dopamine D2 receptor	DRD2	0,100578902	412 / 571
Dopamine D3 receptor	DRD3	0,100578902	144 / 295
Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	0,100578902	346 / 18
Serotonin 2c (5-HT2c) receptor	HTR2C	0,100578902	178 / 88
P2X purinoceptor 7	P2RX7	0,100578902	468 / 29
Dopamine D4 receptor	DRD4	0,100578902	196 / 160
Sigma opioid receptor	SIGMAR1	0,100578902	59 / 273
Arachidonate 12-lipoxygenase	ALOX12	0,100578902	28 / 0
Histone deacetylase 6	HDAC6	0,100578902	384 / 24
Protein kinase C (PKC)	PRKCZ	0,100578902	26 / 0
Tyrosine-protein kinase SYK	SYK	0,100578902	441 / 1
Phospholipase A-2-activating protein	PLAA	0,100578902	12 / 0
Vanilloid receptor	TRPV1	0,100578902	481 / 59
Estrogen receptor beta	ESR2	0,100578902	473 / 16
Monoamine oxidase B	MAOB	0,100578902	522 / 52
Estrogen receptor alpha	ESR1	0,100578902	482 / 18
Acetylcholinesterase	ACHE	0,100578902	236 / 258
Protein kinase C alpha	PRKCA	0,100578902	47 / 0
Cannabinoid receptor 2	CNR2	0,100578902	511 / 80
Glutathione S-transferase A1	GSTA1	0,100578902	3 / 0
Cytochrome P450 17A1	CYP17A1	0,100578902	107 / 0
Apoptosis regulator Bcl-2	BCL2	0,100578902	42 / 10
Monoamine oxidase A	MAOA	0,100578902	281 / 37
Corticotropin releasing factor receptor 1	CRHR1	0,100578902	153 / 0
Beta-adrenergic receptor kinase 2	GRK3	0,100578902	23 / 0

Fonte: obtido do servidor *Swiss Target Prediction*

Tabela 2 (A) - Prováveis alvos de ligação de RIP I obtidos do servidor *Similarity Ensemble Approach*

Alvo	Descrição	P	MaxTC
ESRRG	Estrogen-related receptor gamma	5,41E-39	0.68
NQO2	Ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase [quinone]	1,66E-41	0.64
SIGMAR1	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	2,92E-23	0.59
MTNR1B	Melatonin receptor type 1B	1,49E-186	0.55
CYP2C19	Cytochrome P450 2C19	1.23e-39	0.55
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2	1,08E-27	0.55
CHRM3	Muscarinic acetylcholine receptor M3	1,69E-05	0.54
CHRM1	Muscarinic acetylcholine receptor M1	2,33E-12	0.51
CYP2D6	Cytochrome P450 2D6	2,21E-18	0.50
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	1,03E-50	0.49
DRD2	D(2) dopamine receptor	3,18E-32	0.49
MTNR1A	Melatonin receptor type 1A	4,30E-205	0.47
HDAC3	Histone deacetylase 3	2,77E-37	0.47
OPRM1	Mu-type opioid receptor	7,99E-21	0.47
OPRD1	Delta-type opioid receptor	3,67E-18	0.47
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	4,47E-18	0.45
GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta	1,72E-15	0.44
ADRB1	Beta-1 adrenergic receptor	1,85E-31	0.43
ADRA1A	Alpha-1A adrenergic receptor	5,31E-05	0.43
HSD11B1	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	4,50E-03	0.42
CASP3	Caspase-3	2,38E-09	0.41
HCAR2	Hydroxycarboxylic acid receptor 2	4,60E-06	0.41
CHRM2	Muscarinic acetylcholine receptor M2	1,17E-03	0.40
CASP7	Caspase-7	9,41E-03	0.40
BCL2A1	Bcl-2-related protein A1	9,32E-08	0.39
NR3C2	Mineralocorticoid receptor	3,73E-05	0.39
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	2.73e-07	0.39
P2RX7	P2X purinoceptor 7	1.38e-06	0.38
P2RX4	P2X purinoceptor 4	6,20E-08	0.37
GRIN2B	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	4,44E-13	0.35
APP	Amyloid-beta precursor protein	1,71E-10	0.35
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	2,93E-14	0.34
HRH2	Histamine H2 receptor	6,84E-03	0.33
RELA	Transcription factor p65	6,88E-03	0.33

Tabela 2 (B) - Prováveis alvos de ligação de RIP II obtidos do servidor *Similarity Ensemble Approach*

Alvo	Descrição	P	MaxTC
ESRRG	Estrogen-related receptor gamma	3,12E-28	0.68
SLC6A5	Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2	1,75E-54	0.60
CYP2C19	Cytochrome P450 2C19	7,92E-19	0.52
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2	2,44E-12	0.52
CYP2D6	Cytochrome P450 2D6	1,28E-10	0.52
CHRM3	Muscarinic acetylcholine receptor M3	7,46e-06	0.49
CYP2C9	Cytochrome P450 2C9	5,19E-16	0.48
NQO2	Ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase [quinone]	6,68E-33	0.46
CNR2	Cannabinoid receptor 2	3,71E-16	0.46
CNR1	Cannabinoid receptor 1	1,11e-16	0.46
CHRM1	Muscarinic acetylcholine receptor M1	1,43E-06	0.46
HDAC1	Histone deacetylase 1	2,32E-25	0.44
GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta	3,73e-14	0.44
SIGMAR1	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	3,38E-09	0.44
DRD2	D(2) dopamine receptor	2,16E-15	0.43
BCL2A1	Bcl-2-related protein A1	3,01E-09	0.43
P2RX7	P2X purinoceptor 7	3,82e-08	0.43
MTNR1A	Melatonin receptor type 1A	1,13E-166	0.42
MTNR1B	Melatonin receptor type 1B	5,45E-147	0.42
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	5,36E-15	0.42
HCAR2	Hydroxycarboxylic acid receptor 2	1,89E-12	0.42
HTR2C	5-hydroxytryptamine receptor 2C	3,71E-03	0.41
MCHR1	Melanin-concentrating hormone receptor 1	2,22e-16	0.39
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	3,11E-12	0.39
OPRM1	Mu-type opioid receptor	1,68E-04	0.39
OPRD1	Delta-type opioid receptor	2,52E-04	0.39
CASP3	Caspase-3	4,23E-03	0.39
ADRB1	Beta-1 adrenergic receptor	6,55E-29	0.38
HDAC3	Histone deacetylase 3	4,32E-19	0.38
P2RX4	P2X purinoceptor 4	3,52E-07	0.35
HTR2A	5-hydroxytryptamine receptor 2A	4,26E-04	0.34
HTR1A	5-hydroxytryptamine receptor 1A	3,85E-03	0.34
RELA	Transcription factor p65	9,76E-03	0.31
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	1,78e-12	0.30

Dentre os alvos preditos, foi realizada uma análise crítica para selecionar quais proteínas têm relevância para o presente estudo, direcionando a escolha àquelas proteínas que têm, como base na literatura, papel importante em mecanismos neuroinflamatórios. A via P2X7 – NLRP3 – IL-1 β tem sido amplamente investigada e relacionada aos mecanismos envolvidos em transtornos de humor, o que motivou a investigação dessa via como alvo de RIP I e RIP II. Portanto, foi avaliada a interação dessas moléculas com as proteínas NLRP3, ASC e P2X7.

5.3.2 Cálculos de Docking molecular

5.3.2.1 Interação de RIP I e RIP II com a proteína NLRP3

A Tabela 3 apresenta os parâmetros de interação para RIP I e RIP II com a proteína NLRP3. As energias livres de ligação para ambas as moléculas foram bem semelhantes (RIP I: -7.7 Kcal/mol e RIP II: -7.6 Kcal/mol), porém o valor de RMSD para RIP I foi menor que para RIP II (0.189 e 1.096, respectivamente), embora ambos sejam menor que 2.0, valor desejável, indicando que são interações prováveis.

Tabela 3 – Lista de parâmetros e pontuação gerados a partir de encaixe molecular da interação entre a proteína NLRP3 e RIP I ou RIP II.

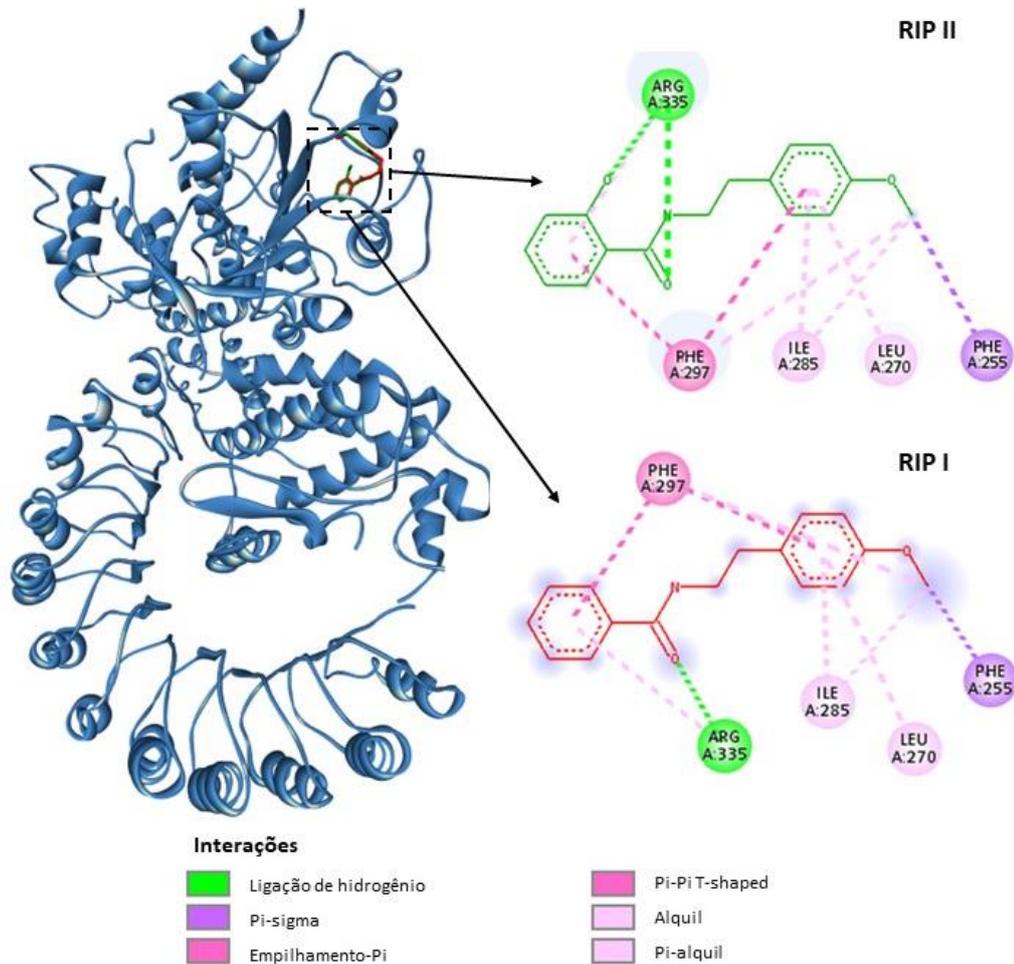
Ligante	Energia de ligação	RMSD
RIP I	-7.7 Kcal/mol	0.189
RIP II	-7.6 Kcal/mol	1.096

Foram analisados também a categoria das interações intermoleculares, a distância entre as ligações e os aminoácidos envolvidos. A Tabela 4 mostra que RIP I interagiu com os aminoácidos Arg335 por ligação de hidrogênio e com Phe255, Ile285, Leu270, Ile285 e Arg335 por interações hidrofóbicas. RIP II interagiu com o aminoácido Arg335 por ligação de hidrogênio e com Phe297 por ligação hidrofóbica do tipo empilhamento-Pi, a qual refere-se à interação entre anéis aromáticos, além de Phe255, Ile285, Leu270, Ile285 por interações hidrofóbicas (Figura 22).

Tabela 4 - Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre RIP I e RIP II e a proteína NLRP3

Ligante	Ligações de hidrogênio	Distância	Interações hidrofóbicas	Distância
RIP I	ARG 335	3,35309	PHE 255	3,81066
			PHE 297	3,74931
			PHE 297	5,79022
			ILE 285	4,42919
			PHE 297	5,29742
			LEU 270	5,207
			ILE 285	5,09969
			ARG 335	5,1472
RIP II	ARG 335	3,14335	PHE 255	3,79455
	ARG 335	3,18993	PHE 297	3,8982
			PHE 297	5,77909
			ILE 285	4,54615
			PHE 297	5,23819
			LEU 270	5,28507
			ILE 285	5,01707
			ARG 335	4,51872

Figura 22 – Complexo RIP I e RIP II e proteína NLRP3 (Esquemas em 3D e 2D)



Fonte: Discovery Studio Visualizer 2020

5.3.2.2 Interação de RIP I e RIP II com a proteína ASC

Sabe-se que a ativação do inflamassoma NLRP3 requer a interação, mediada por ASC, da proteína sensora NLRP3 com caspase-1. ASC interage com a proteína NLRP3 através de seu domínio de pirina (PYD) e recruta enzimas caspase através de seu domínio de ativação e recrutamento de caspase (CARD). Portanto, foi realizada também a investigação da ligação de RIP I com a proteína ASC.

Ao avaliar a interação de RIP I e RIP II (Figura 23) com ASC, a energia de ligação foi -6.0 e -6.1 Kcal/mol, respectivamente, apresentando interação com o resíduo Ser195, por ligação de hidrogênio, um importante resíduo ativo. RIP II apresentou mais duas ligações de hidrogênio com os resíduos His118 e Leu192 (Tabelas 5 e 6).

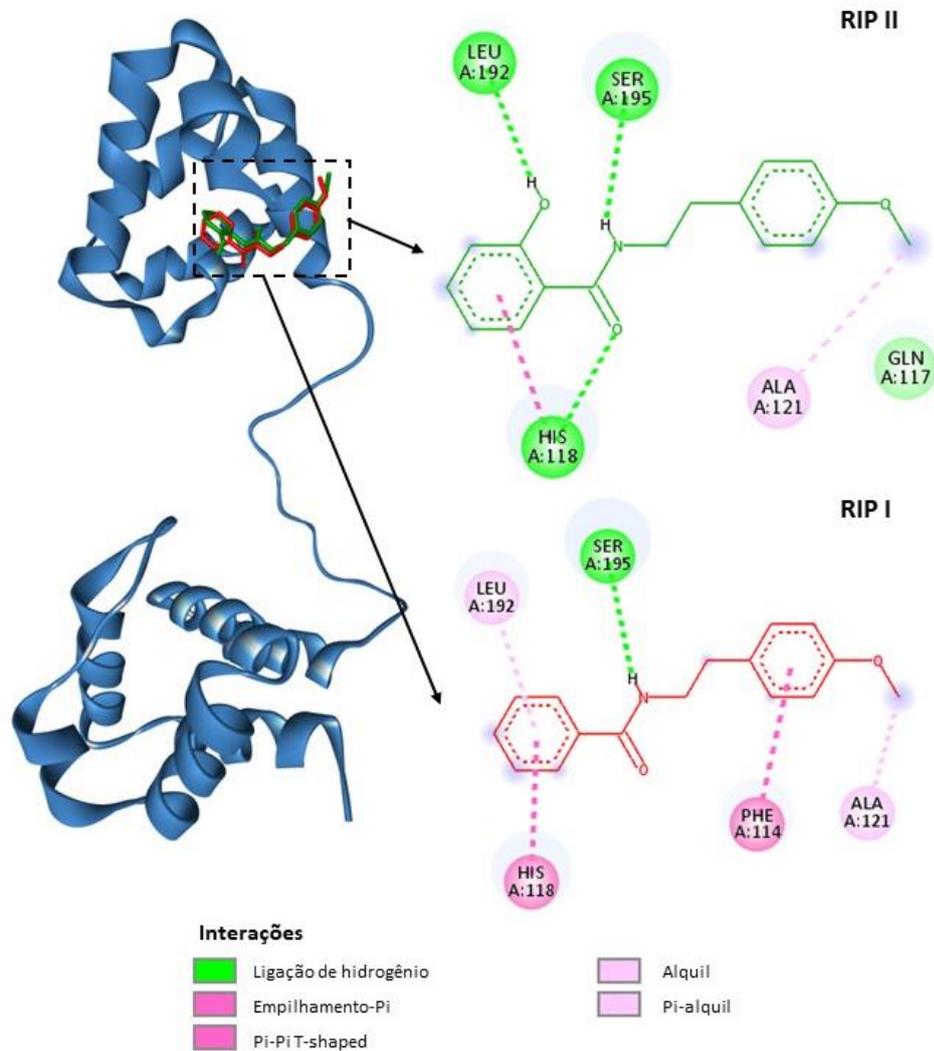
Tabela 5 – Lista de parâmetros e pontuação gerados a partir de encaixe molecular da interação entre a proteína ASC e RIP I ou RIP II.

Ligante	Energia de ligação	RMSD
RIP I	-6.0 Kcal/mol	0.690
RIP II	-6.1 Kcal/mol	1.422

Tabela 6 - Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre a proteína ASC e RIP I ou RIP II

Ligante	Ligações de hidrogênio	Distância	Interações hidrofóbicas	Distância
RIP I	SER 195	2,63249	HIS 118	4,27082
			PHE 114	5,31029
			ALA 121	3,80342
			LEU 192	5,48067
RIP II	HIS 118	2,55325	HIS 118	3,90419
	SER 195	2,05424	ALA 121	3,98328
	LEU 192	2,36174		

Figura 23 – Complexo RIP I e RIP II e proteína ASC (Esquemas em 3D e 2D)



Fonte: Discovery Studio Visualizer 2020

5.3.2.3 Interação de RIP I e RIP II com a proteína P2X7

A liberação de IL-1 β pela micróglia via ativação do inflamassoma NLRP3, pode ter a participação de P2X7, um receptor purinérgico ativado por ATP presente em diversas células, incluindo a membrana microglial. Desse modo, a fim de investigar o mecanismo anti-neuroinflamatório de RIP I e RIP II em concomitância com o possível bloqueio de P2X7, os cálculos de docking molecular foram realizados também para este alvo proteico.

Como representado nas Tabelas 7 e 8, as interações entre RIP I e RIP II e P2X7, apresentaram energia de ligação de -7.1 e -7.0 Kcal/mol, respectivamente. RIP I apresentou interação com ligação de hidrogênio no resíduo Ser101, enquanto RIP II com ligação de

hidrogênio nos resíduos Lys110 e Glu112. A Figura 24 mostram os complexos formados entre as moléculas e a proteína P2X7.

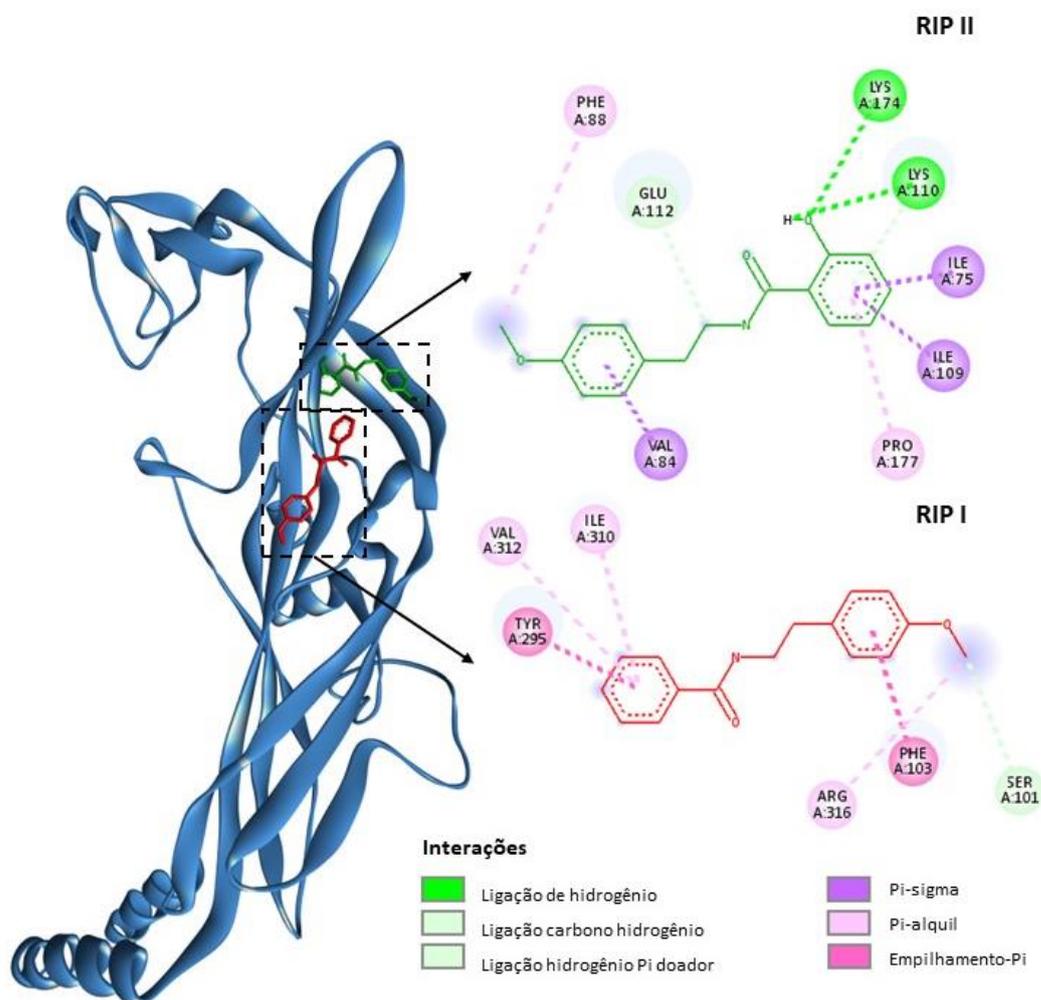
Tabela 7 - Lista de parâmetros e pontuação gerados a partir de encaixe molecular da interação entre a proteína P2X7 e RIP I ou RIP II

Ligante	Energia de ligação	RMSD
RIP I	-7.1 Kcal/mol	0.141
RIP II	-7.0 Kcal/mol	0.151

Tabela 8 - Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre a proteína P2X7 e RIP I ou RIP II

Ligante	Ligações de hidrogênio	Distância	Interações hidrofóbicas	Distância
RIP I	SER 101	3,706	PHE 103	4,86988
			TYR 295	3,69719
			ARG 316	4,45876
			ILE 310	5,35802
			VAL 312	5,45197
RIP II	LYS 110	2,75868	ILE 75	3,48027
	GLU 112	3,6387	VAL 84	3,45371
	LYS 110	4,18869	ILE 109	3,89115
			PHE 88	5,0019
			PRO 177	5,34785

Figura 24 – Complexo RIP I e RIP II e proteína P2X7 (Esquemas em 3D e 2D)



Fonte: Discovery Studio Visualizer 2020

5.3.3 Predição Farmacocinética

As predições de ADME *in silico* foram realizadas para avaliar os perfis farmacocinéticos de RIP I e RIP II e os resultados são mostrados na Tabela 9, 10 e 11. De acordo com a regra dos 5 de Lipinsk, ambas RIP I e RIP II apresentam boa disponibilidade oral, pois não violaram nenhuma das regras. Além disso, o valor de LogS mostra que ambos os compostos são solúveis em água (LogS entre -4 e -2), uma característica fundamental para uma biodisponibilidade apropriada.

Tabela 9 – Regra dos 5 de Lipinski para RIP I e RIP II avaliada no servidor *Swiss ADME*

	Peso Molecular	iLog P	Doadores de Hidrogênio	Aceptores de Hidrogênio	Violações de Lipinski
RIP I	255,31 g/mol	2,83	1	2	0
RIP II	271,31 g/mol	2,47	2	3	0

Tabela 10 – Propriedades físico-químicas de RIP I e RIP II avaliadas no servidor *Swiss ADME*

	Log S (ESOL)	Log S (Ali)	Log S (SILICOS)	Número de rotações	TPSA
RIP I	-3.47 (S)	-3.60 (S)	-5.86 (MS)	6	38.33 Å ²
RIP II	-3.66 (S)	-4.23 (MS)	-5.28 (MS)	6	58.56 Å ²

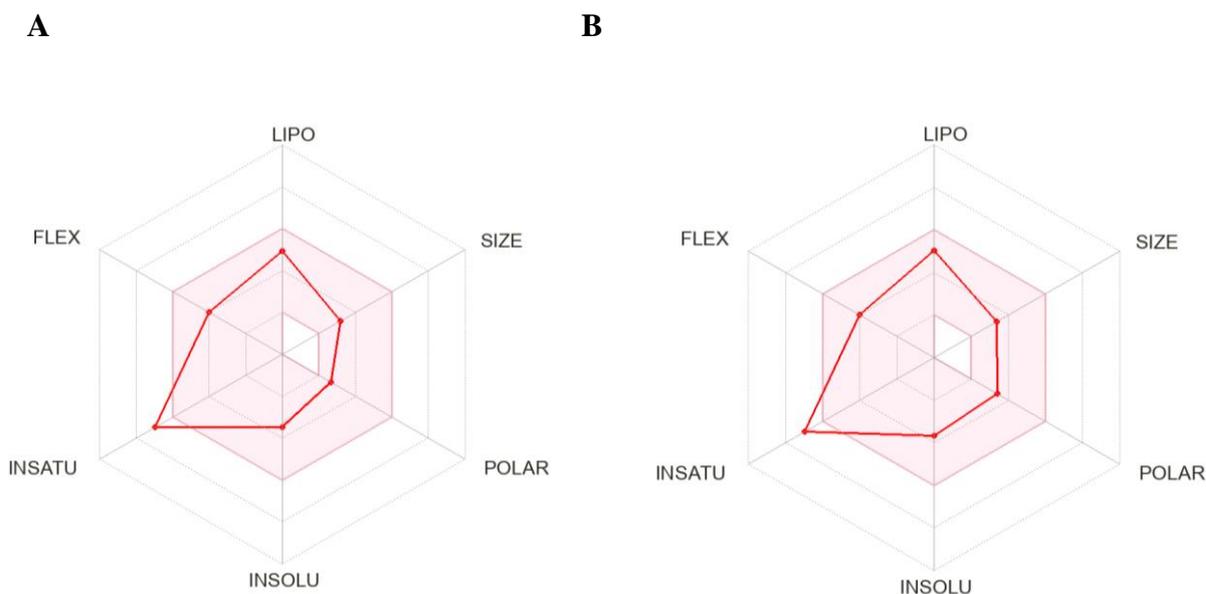
TPSA: Tensão em área de superfície polar; S: solúvel; MS: moderadamente solúvel

Tabela 11 – Propriedades ADME para RIP I e RIP II avaliadas no servidor *Swiss ADME*

	Absorção GI	Permeabilidade BHE	Substrato Gp-P	Inibidor CYP				
				1A2	2C19	2C9	2D6	3A4
RIP I	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não
RIP II	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não

As moléculas também foram analisadas utilizando-se o gráfico de correlação *Bioavailability Radar*, o qual apresenta a correlação entre tamanho da molécula, flexibilidade, solubilidade, lipofilicidade, saturação e polaridade (Gráfico 3-A e B):

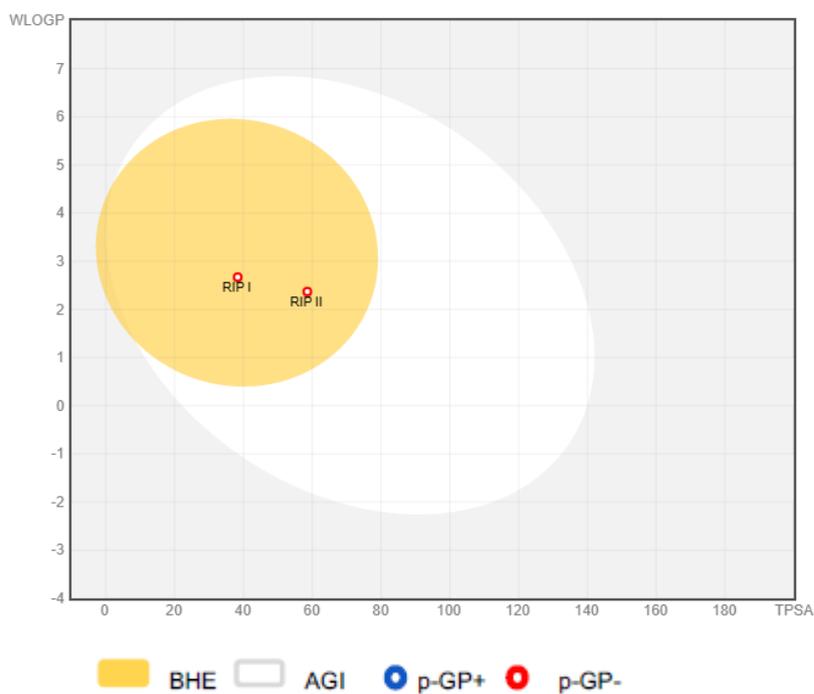
Gráfico 3 – Radar de biobisponibilidade de RIP I (A) e RIP II (B)



Legenda: a área rosa representa as condições excelentes para biodisponibilidade na administração por via oral. LIPO: lipofilicidade (XLOGP3 entre -0.7 e $+5.0$), SIZE: tamanho (peso molecular entre 150 e 500 g/mol), POLAR: polaridade (TPSA entre 20 e 130 Å²). INSOLU: solubilidade ($\log S < 6$), INSATU: saturação (fração de carbonos na hibridização $sp^3 \geq 0.25$) FLEX: flexibilidade (< 9 ligações rotativas) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Quanto à interação com a p-glicoproteína, ambas as moléculas não se mostraram substratos para tal. A associação de uma molécula com p-gp como substrato pode interferir na sua ação. A probabilidade de penetração cerebral e absorção passiva no trato gastrointestinal para as duas moléculas pode ser representada no Gráfico 4 do tipo BOILED-Egg, o qual avalia os parâmetros descritos em função da posição das moléculas no WLogP-vs-TPSA.

Gráfico 4 – Correlação entre WLogP e TPSA, na forma de BOILED-Egg, para RIP I e RIP II



Legenda: BHE – moléculas na área amarela do gráfico são capazes de cruzar a barreira hematoencefálica; AGI – moléculas absorvidas passivamente pelo trato gastrointestinal; p-GP+: moléculas que se associam com glicoproteína P; p-GP-: moléculas que não se associam com glicoproteína-P.

6 DISCUSSÃO

A depressão tem sido associada ao estresse nos últimos anos, como resultado de inúmeras pesquisas que mostram a relação entre eventos estressores e o surgimento de sintomas depressivos, em decorrência de alterações epigenéticas (PARK *et al.*, 2019; TORRES-BERRÍO *et al.* 2019; YANG *et al.*, 2015). O estresse crônico, relacionado à perturbação da homeostasia, induz uma série de alterações, dentre as quais, a disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), a alteração neurobiológica mais comum em pacientes depressivos, manifesta em cerca de 70% destes (HOLSBOER, 2000; YANG *et al.*, 2015).

Os modelos animais constituem uma útil ferramenta para a investigação da neurobiologia de transtornos mentais, como a depressão associada ao estresse. Dentre esses modelos, o Estresse Crônico Imprevisível (ECI) tem sido largamente utilizado, por enfatizar o papel do estresse na depressão. Neste modelo, os animais desenvolvem gradualmente um comportamento depressivo-símile devido à sequência imprevisível de exposição aos estressores, resultado de alterações neurobiológicas semelhantes àquelas observadas em pacientes depressivos, como disfunção do eixo HHA, desregulação nos níveis de citocinas e aumento da peroxidação lipídica (FARIA *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2019; XUE *et al.*, 2015).

No presente trabalho foi possível observar o desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo nos animais submetidos ao ECI, evidenciado primariamente pela realização de testes comportamentais. Esse resultado mostra a eficácia do modelo, quando realizado durante 28 dias, como também demonstrado em estudos anteriores (DE SOUZA *et al.*, 2022; GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2014)

Considerando a realização de testes comportamentais, o teste do nado forçado é descrito como padrão ouro para investigação da atividade antidepressiva de drogas. Esse teste baseia-se no pressuposto de que a imobilidade representa uma medida de desespero comportamental, sendo considerada uma incapacidade ou relutância em manter o esforço. O aumento do comportamento passivo, como a imobilidade, e a diminuição do comportamento ativo, como o nado e a escalada, são indicativos de comportamentos tipo-depressivos (LUCKI, 1997; PORSOLT *et al.*, 1977).

Estudos anteriores, utilizando modelos agudo e crônico de estresse por administração repetida de corticosterona, já demonstraram a capacidade de RIP I e RIP II de diminuir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, o que comprova sua atividade antidepressiva (DE SOUSA *et al.*, 2014a; LOPES *et al.*, 2018; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et*

al., 2013). No entanto, após exposição a fatores estressores variados e imprevisíveis, como ocorre no ECI, diversos circuitos cerebrais podem ser afetados (NOLLET, 2021). No presente estudo, RIP I e RIP II apresentaram a capacidade de reverter o comportamento similar ao desespero, interpretado como depressivo-símile, causado pelo ECI. Estes resultados confirmam que o efeito antidepressivo-símile de RIP I e RIP II é detectado tanto após uma administração repetida de corticosterona, em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, como após exposição a estímulos diferentes e imprevisíveis.

A anedonia é frequentemente relatada em pacientes depressivos, caracterizada pela capacidade reduzida de experimentar prazer a partir de recompensas naturais. Por ser um dos sintomas mais difíceis de tratar, muitos esforços têm sido empenhados no desenvolvimento de novos fármacos, visto que cerca de 37% dos pacientes tratados com antidepressivos convencionais não apresenta resposta adequada (PATEL, 2016; TREADWAY; ZALD, 2011).

Embora seja difícil desenvolver e avaliar em animais a característica de anedonia, foi possível, com o conhecimento da neurobiologia da depressão, desenvolver testes comportamentais que indiquem a presença de comportamento anedônico nos animais. O teste de preferência por sacarose tem sido um dos mais utilizados, baseando-se na escolha entre dois líquidos, pois sabe-se que naturalmente os roedores consomem, com mais avidez, soluções doces, em detrimento de água. No entanto, já descrito na literatura que esses animais, quando submetidos a modelos de depressão induzidos por estresse, têm essa preferência natural por soluções açucaradas diminuída (LIU *et al.*, 2018).

No presente estudo, RIP I e RIP II mostraram-se igualmente capazes de reverter a diminuição da preferência por sacarose causada pelo estresse crônico. Por ser um parâmetro associado à atividade dopaminérgica, este resultado corrobora estudos realizados anteriormente, nos quais sugere-se a atividade de RIP I e RIP II sobre receptores D1 e D2 dopaminérgicos (DE SOUSA *et al.*, 2014a; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Este é um achado relevante, considerando que a anedonia permanece como um sintoma difícil de tratar com antidepressivos disponíveis e a presença de sintomas anedônicos prediz uma baixa resposta ao tratamento em geral (TREADWAY; ZALD, 2011).

Vale salientar que a anedonia também está relacionada ao comportamento social comprometido, classicamente observado em pacientes deprimidos, caracterizando um importante prejuízo na qualidade de vida (LLERENA *et al.*, 2012; VINCKIER; GOURION; MOUCHABAC, 2017). Por outro lado, sabe-se que um comprometimento na sociabilidade e comportamento social desregulado é reconhecido como característica marcante de muitas desordens psiquiátricas, resultando em um risco aumentado para depressão (GILHOTRA;

DHINGRA, 2010). Com base nessas considerações, neste trabalho, foi realizado o teste de interação social, um dos mais utilizados para avaliar a livre escolha de interagir ou não com outro animal (KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2011).

Nossos achados mostram que a exposição ao ECI causou severo comprometimento no comportamento social, como também foi demonstrado por outros autores (CHAI *et al.*, 2019; SANDI; HALLER, 2015). O tratamento com RIP I ou RIP II foi capaz de reverter esse prejuízo, de maneira marcante, mostrando um potencial importante, visto que o déficit social em pacientes depressivos pode persistir mesmo após remissão dos sintomas afetivos, prejudicando a qualidade de vida do indivíduo e favorecendo a ocorrência de novos quadros depressivos (GILHOTRA; DHINGRA, 2010; VINCKIER; GOURION; MOUCHABAC, 2017). Atualmente, sabe-se que a depressão envolve uma integração de fatores, dentro de um modelo biopsicossocial, assim, faz-se necessário que um antidepressivo disponível seja capaz, além de tratar sintomas afetivos, de influenciar positivamente a inserção social.

Evidências científicas mostram que o comprometimento social nos animais parece estar relacionado à disfunção no eixo HHA, que resulta em altos níveis de corticosterona, hormônio semelhante ao cortisol em humanos (BARIK *et al.*, 2013; SANDI; HALLER, 2015). Em estudos anteriores, RIP I e RIP II também apresentaram efeito antidepressivo em modelo de depressão induzida por administração crônica de corticosterona, corroborando para demonstrar sua capacidade de reverter os comportamentos alterados pela disfunção do eixo HHA, apontando uma perspectiva terapêutica (LOPES *et al.*, 2018; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Na prática clínica, é comum a presença concomitante de um transtorno depressivo e sintomas de ansiedade proeminentes, em cerca de 70% dos indivíduos, os quais podem apresentar maior disfunção social, gravidade dos sintomas depressivos e risco aumentado de suicídio. Além disso, a comorbidade pode ser um fator complicador, com maior propensão à resistência ao tratamento padrão com antidepressivos (FAVA *et al.*, 2008; GARBER; WEERSING, 2010; OUDE VOSHAAR *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2013). Em vista disso, o potencial das riparinas I e II em sintomas ansiedade-símile foi investigado.

Para a investigação de atividade ansiolítica/ansiógênica de drogas, testes comportamentais não clínicos têm sido úteis. No teste do campo aberto, o parâmetro de *rearing* tem sido utilizado para avaliar ansiedade, embora ainda haja, na literatura, discordância sobre a relação direta dessa avaliação. Esse parâmetro, caracterizado por um movimento de exploração vertical, parece estar aumentado em animais em estado ansiedade-símile (ENNACEUR, 2014; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Como demonstrado neste

trabalho, o ECI aumentou significativamente o parâmetro *rearing* no teste do campo aberto, provocando um comportamento semelhante à ansiedade, como descrito anteriormente por alguns autores (DE SOUZA *et al.*, 2022; LU *et al.*, 2018) e RIP I reverteu esse comportamento.

Embora esse único parâmetro isoladamente não possa confirmar a atividade ansiolítica, esse resultado corrobora estudos já realizados pelo nosso grupo, com teste de labirinto em cruz elevado e placa perfurada em modelo agudo e crônico, nos quais RIP I apresentou atividade ansiolítica (DE SOUSA *et al.*, 2005; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021). Quanto ao parâmetro número de *groomings*, encontra-se resultados diversos na literatura, mas muitos autores concordam que o estresse é capaz de aumentar o número de *groomings* como uma característica ansiogênica (PAPALEO *et al.*, 2011; SHMELKOV *et al.*, 2010). Embora seja um parâmetro relacionado à atividade dopaminérgica, sobre a qual RIP I e RIP II parecem ter efeito (DE SOUSA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013), no nosso trabalho, não houve diferença entre os grupos.

Quanto à atividade locomotora, esta também não foi alterada em nenhuma das condições, mostrando que RIP I, RIP II e FLU não alteraram a capacidade de locomoção dos animais. Esse parâmetro encontra resultados diversos na literatura. Alguns estudos apresentam diminuição da atividade locomotora em animais expostos ao ECI (DE SOUSA *et al.*, 2022), enquanto outros não encontram alteração (DE SOUZA *et al.*, 2022). A observação desse parâmetro foi de grande importância, visto que, pode-se inferir a respeito da influência das drogas utilizadas sobre o nível de excitabilidade do SNC. Segundo a literatura, a diminuição da atividade locomotora espontânea pode estar relacionada à sedação resultante da depressão do SNC, enquanto o aumento desse parâmetro pode estar associado a um efeito psicoestimulante (PRUT; BELZUNG, 2003). O resultado obtido exclui a possibilidade de que, nos testes em que se utiliza como parâmetro o tempo de imobilidade, por exemplo, os animais estejam respondendo devido a uma ação sedativa ou estimulante das drogas.

Além das alterações emocionais, são comuns as disfunções cognitivas em pacientes depressivos, sendo estas muito mais duradouras, podendo permanecer mesmo nos períodos de remissão (MCINTYRE *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019). Os sintomas cognitivos demonstraram predizer desfechos clínicos em termos de curso da doença e taxas de resposta e remissão, bem como prognósticos dos pacientes para restaurar o funcionamento social e ocupacional (WANG *et al.*, 2019). Dentre as alterações cognitivas, o comprometimento de memória é altamente preditivo de resultados funcionais e se correlaciona com a cronicidade da doença (KWAK; YANG; KOO, 2016).

Em estudos com animais, o teste de reconhecimento do objeto novo é uma ferramenta útil para avaliar memória episódica, o qual permite observar o comportamento do animal quando exposto a um objeto novo e um objeto familiar. A característica natural do animal é gastar mais tempo explorando o objeto novo do que o familiar (ENNACEUR, 2010). Além da memória episódica, a memória de trabalho espacial também pode ser avaliada em animais, por meio do labirinto em Y, no qual os animais tendem a utilizar locais específicos do aparato para se localizar (SARTER; BODEWITZ; STEPHENS, 1988). A memória de trabalho espacial está essencialmente relacionada à ação direcionada a um objetivo, o qual inclui a localização de um recurso, de uma ameaça ou de si mesmo em um ambiente dinâmico, sendo requeridas, para tal, representações de características espaciais (SPELLMAN *et al.*, 2015).

Dentre as áreas cerebrais envolvidas nos processos cognitivos, o hipocampo está essencialmente relacionado aos processos de aprendizado e memória, além de prazer e recompensa, e parece haver uma participação conjunta do córtex pré-frontal medial e do hipocampo na execução bem-sucedida de tarefas que requerem memória de trabalho espacial (COLCIAGO *et al.*, 2015; SPELLMAN *et al.*, 2015).

A exposição crônica ao estresse é relacionada a danos no aprendizado e memória, em decorrência da disfunção do eixo HHA, levando a altas concentrações de glicocorticoides em regiões cerebrais. Os receptores de glicocorticoides estão presentes em grande densidade no hipocampo, tornando essa área mais suscetível aos danos causados por altos níveis de cortisol (COLCIAGO *et al.*, 2015).

No presente trabalho, a exposição ao estresse crônico causou um dano significativo nas respostas cognitivas avaliadas nos animais. De fato, alguns estudos não-clínicos e clínicos mostram a associação entre o estresse crônico e dano neuronal e apoptose que cursa com redução do volume de áreas cerebrais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, além de redução de proteínas sinalizadoras importantes no hipocampo (ALKADHI; TRAN, 2015; FAROOQI *et al.*, 2018).

Além disso, por serem o aprendizado e a memória elementos relacionados à plasticidade do SNC, alterações na capacidade de desenvolvimento e preservação neuronal mediada por fatores neurotróficos, pode ser um dos fatores relacionados aos danos cognitivos apresentados nos quadros de depressão (ORTIZ *et al.*, 2014).

RIP I e RIP II foram capazes de melhorar as respostas dos animais às avaliações cognitivas. De fato, em estudos anteriores ficou comprovada a capacidade de RIP I e RIP II aumentarem os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo de

animais submetidos ao estresse induzido por administração repetida de corticosterona (LOPES *et al.*, 2018; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Diante da necessidade de tratamentos satisfatórios para os déficits cognitivos que usualmente acompanham os estados depressivos, configura-se um desafio constante para a pesquisa em psicofarmacologia o desenvolvimento de drogas que apresentem boa resposta para ambos os déficits.

Ainda há uma baixa resposta aos antidepressivos disponíveis quanto aos danos cognitivos comumente presentes na depressão. Um estudo prospectivo com 598 pacientes mostrou que os sintomas cognitivos, ainda que reduzidos, continuaram presentes em um terço dos pacientes, mesmo após o sexto mês de tratamento com antidepressivos (WANG *et al.*, 2019). Esse resultado já era esperado visto que em outros estudos, as classes de antidepressivos utilizados não apresentaram evidência de melhorar a performance cognitiva, visto que esta não parece depender da melhora dos sintomas afetivos, como indicado pela comum apresentação de sintomas cognitivos residuais mesmo em pacientes em remissão dos sintomas depressivos (BAUNE; BRIGNONE; LARSEN, 2018; ROSENBLAT; KAKAR; MCINTYRE, 2016; WANG *et al.*, 2019).

Torna-se clara, portanto, a perspectiva futura da utilização de RIP I e RIP II em pesquisas clínicas, visto que sua atividade antidepressiva se mostrou acompanhada de efeitos benéficos também sobre os comportamentos relativos à anedonia, interação social e desempenho cognitivo.

A depressão cursa, além das alterações comportamentais, com alterações neuroquímicas correspondentes aos diversos mecanismos fisiopatológicos e áreas cerebrais envolvidas. Dentre os mecanismos descritos para explicar as alterações comportamentais, a hipótese neuroinflamatória tem sido expandida nos últimos anos, em vista das lacunas deixadas pela conhecida hipótese monoaminérgica, na qual se baseia a maioria dos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da depressão. Mecanismos envolvidos na hiperativação neuroimune estão relacionados ao surgimento de alterações comportamentais afetivas e cognitivas, apontando para um papel essencial de células gliais, principalmente astrócitos e micróglia (LENG *et al.*, 2018; TROUBAT *et al.*, 2021; YIRMIYA; GOSHEN, 2011).

Os astrócitos, sendo as mais numerosas e versáteis células gliais, são cruciais para o ambiente neuronal, exercendo função de regulação no metabolismo da glicose, captação de neurotransmissores, desenvolvimento sináptico e maturação da barreira hematoencefálica (RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013).

A disfunção astrocítica tem sido largamente implicada na patogênese da depressão (RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013; SANACORA; BANASR, 2013; WANG *et al.*, 2017b). Como o mais abundante tipo celular no cérebro, os astrócitos exercem um papel central na regulação da neuroinflamação, envolvendo atividade proeminente relacionada ao NF- κ B. A hiperativação de NF- κ B leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , que também tem um papel chave na manifestação dos sintomas depressivos (CAVIEDES *et al.*, 2017; FARINA; ALOISI; MEINL, 2007; LENG *et al.*, 2018).

Estudos de contagem celular em humanos pós-morte, relatam diminuição da densidade ou número de células gliais no cérebro de pacientes diagnosticados com transtorno depressivo maior (BOWLEY *et al.*, 2002; GITTINS; HARRISON, 2011; ONGUR; DREVETS; PRICE, 1998). Além disso, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um importante marcador de astrócitos, mostrou-se significativamente diminuída em regiões cerebrais de indivíduos jovens com depressão. No entanto, em pacientes mais velhos, GFAP mostrou-se aumentada, o que pode refletir uma reação compensatória ao dano neuronal relatado nesses pacientes (COBB *et al.*, 2016; RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013).

Quanto aos achados não clínicos, estudos mostraram que diferentes tipos de estresse causam redução da imunorreatividade de GFAP em regiões corticais, no hipocampo e na amígdala (ARAYA-CALLÍS *et al.*, 2012). Banasr *et al.* (2010) relataram a diminuição de GFAP mRNA no córtex pré-frontal de ratos submetidos a estresse crônico moderado. Ademais, Rajkowska e Stockmeier (2013) sugerem que níveis elevados de glicocorticoides, diminuem significativamente a expressão de mRNA para GFAP, com redução da densidade de astrócitos na depressão. Em consequência, há um acúmulo de glutamato extracelular, em vista do reduzido número de transportadores EAAT1 e EAAT2 (do inglês, *Excitatory Amino Acid Transporters*) localizados nos astrócitos, o qual pode ser tóxico para neurônios GABA (BANASR *et al.*, 2010; HAROON; MILLER; SANACORA, 2017).

No nosso estudo, o ECI causou uma considerável diminuição na marcação de GFAP nas três áreas hipocâmpais avaliadas, resultado consoante ao encontrado na literatura (AYUOB *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020b, 2013; YAO *et al.*, 2021). RIP I foi capaz de reverter esse dano no CA1 e giro denteado. Esse é um achado promissor, visto que as alterações comportamentais advindas de estresse crônico em animais têm sido associadas a diminuição de GFAP e alguns antidepressivos não previnem esse efeito (ARAYA-CALLÍS *et al.*, 2012). RIP I, no entanto, pode estar apresentando seus efeitos antidepressivos por meio de modulação na função astrocítica.

Adicionalmente aos astrócitos, a micróglia é outro tipo de célula residente no SNC, com funções imunológicas semelhantes às dos macrófagos periféricos. Em situações fisiológicas, a micróglia permanece no estado de vigilância (HAROON; MILLER; SANACORA, 2017), e está envolvida no controle de processos como sinaptogênese e neurogênese, por meio da liberação de substâncias bioativas, incluindo citocinas, fatores neurotróficos, quimiocinas e neurotransmissores. No entanto, em situações de perturbação na homeostase, a micróglia passa para um fenótipo ativado, resultando em resposta inflamatória e eliminação de patógenos e células lesadas. Em doenças neurodegenerativas, a micróglia induz secreção anormal de substâncias tóxicas, como espécies reativas de oxigênio e citocinas, resultando em dano às sinapses (CHAVES-FILHO *et al.*, 2019)

As células microgliais estão em alta densidade no hipocampo, principalmente na região CA1; sua ativação pode ser originada pelo estresse e parece estar implicada na fisiopatologia da depressão e outras doenças psiquiátricas relacionadas ao estresse. Vários estudos em humanos sugerem um papel da micróglia na depressão, incluindo estudos pós-morte por suicídio, mostrando um aumento na micróglia ativada. Essa ativação foi demonstrada em áreas como o córtex pré-frontal e córtex cingulado anterior durante episódios graves do transtorno, e é positivamente correlacionada com a gravidade do episódio (SETIAWAN *et al.*, 2015; STEINER *et al.*, 2008; YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015).

Além dos achados clínicos, muitos estudos com modelos animais têm apresentado ativação microglial em resposta ao estresse crônico, principalmente no hipocampo, acompanhada de redução da neurogênese e manifestação de comportamento depressivo-símile (BASSETT *et al.*, 2021; KREISEL *et al.*, 2014; TONG *et al.*, 2017; TYNAN *et al.*, 2010). Esse fenômeno foi observado em nosso estudo, no qual as áreas hipocâmpais GD, CA1 e CA3 apresentaram intensa ativação microglial após exposição ao ECI, avaliada por meio do marcador de microglia Iba-1, e RIP I e RIP II apresentaram a capacidade de reduzir essa condição. Essa alteração também foi refletida no comportamento tipo depressivo dos animais.

A ativação microglial é comumente explicada em termos de dois estados: os fenótipos M1 e M2, os quais estão associados fenomenologicamente com lesão e homeostase, respectivamente. Quando classicamente ativada, a micróglia libera substâncias pró-inflamatórias, como as citocinas IL-1 β , TNF, IL-6, IL-12, IFN- γ e a quimiocina CCL2, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DUBOVICKÝ *et al.*, 2014; HAROON; MILLER; SANACORA, 2017; SUBRAMANIAM; FEDEROFF, 2017). Extensivo número de estudos apontam a depressão como uma doença inflamatória e crescentes evidências sugerem que a

persistente ativação microglial tem um papel importante na fisiopatologia inflamatória da depressão, visto que elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da depressão (MILLER; RAISON, 2016; TROUBAT *et al.*, 2021; YIRMIYA; RIMMERMAN; RESHEF, 2015).

De fato, pacientes depressivos apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico e fluido cerebrospinal, como IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α , os quais são capazes de alcançar o ambiente cerebral e podem interagir com muitos circuitos fisiopatológicos que caracterizam a depressão, como metabolismo de neurotransmissores e plasticidade sináptica, ocasionando alterações comportamentais (DOWLATI *et al.*, 2010; DUBOVICKÝ *et al.*, 2014; ENACHE; PARIANTE; MONDELLI, 2019).

Do mesmo modo, estudos não clínicos revelam que a exposição a estresse de diversos tipos aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias em áreas cerebrais como o hipocampo e o córtex pré-frontal (CHAVES *et al.*, 2020; DE SOUZA *et al.*, 2022; MALLMANN *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2019). As alterações comportamentais induzidas por citocinas estão associadas principalmente a alterações no metabolismo de neurotransmissores, como serotonina, noradrenalina e dopamina em áreas cerebrais relacionadas à regulação das emoções e recompensa, como o sistema límbico. Citocinas pró-inflamatórias podem levar à redução da síntese de serotonina e aumento dos níveis de metabólitos neurotóxicos, por meio da conversão de triptofano em quinurenina, podendo levar a apoptose neuronal e dano a células gliais (DUBOVICKÝ *et al.*, 2014; MAES *et al.*, 2011).

A citocina TNF- α mostrou-se portadora de um importante papel no controle da transmissão excitatória no SNC, em condições fisiológicas. TNF- α é constitutivamente expressa em baixos níveis no cérebro adulto normal e é importante na plasticidade sináptica. O controle da transmissão excitatória por TNF- α está relacionado à coordenação da liberação de glutamato dos astrócitos em resposta ao aumento intracelular de Ca²⁺ em um processo chamado de gliotransmissão (PROBERT, 2015; SANTELLO; BEZZI; VOLTERRA, 2011; WANG *et al.*, 2017a).

A neuroproteção contra a toxicidade do glutamato mediada por TNF- α pode estar relacionada à inibição de EAAT e a promoção de sinaptogênese está relacionada à estimulação da atividade pós-sináptica de AMPA. No entanto, embora apresente ações protetoras em níveis fisiológicos, durante a ativação imune, os níveis de TNF- α podem ser elevados sobremaneira, levando à ativação persistente de NF- κ B e neurotoxicidade e também aumento de estresse oxidativo e nitrosativo (HAROON; MILLER; SANACORA, 2017;

MAES *et al.*, 2009; SANTELLO; BEZZI; VOLTERRA, 2011). As concentrações elevadas de TNF- α também promovem a depressão hipocampal de longo prazo (do inglês, LTD), principalmente na área CA1, impactando negativamente nos mecanismos relacionados ao aprendizado e à memória (BORTOLATO *et al.*, 2015; BUTLER; O'CONNOR; MOYNAGH, 2004). No contexto clínico, níveis séricos elevados de TNF- α foram associados à ausência de resposta ao tratamento com escitalopram (BORTOLATO *et al.*, 2015; ELLER *et al.*, 2008).

No presente trabalho, níveis aumentados de TNF- α foram encontrados no hipocampo de animais submetidos cronicamente a eventos estressores, em conjunto com alterações comportamentais cognitivas. Os níveis de TNF- α mostraram-se diminuídos após tratamento com RIP I e RIP II, e essa atividade necessita de maior investigação posterior quanto ao possível envolvimento na transmissão glutamatérgica.

Além de TNF- α , a citocina IL-1 β tem sido implicada na patogênese da depressão. Sendo majoritariamente produzida pela micróglia, embora essa não seja a única fonte, em baixas concentrações IL-1 β exerce importantes funções nas células do SNC, como poda sináptica, porém, em níveis elevados, leva a alterações imunológicas como as caracterizadas na neuroinflamação. Dentre as ações de IL-1 β , após ligação com seu receptor, está a indução da ativação de uma cascata complexa que culmina na ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B e subsequente expressão gênica (CHAVES-FILHO *et al.*, 2019).

Dentre as funções mais estudadas da IL-1 β está a sua relação com a formação de memórias. Várias linhas de evidência indicam que ela é necessária para alguns processos de aprendizagem e memória, particularmente para a consolidação da memória que depende do bom funcionamento do hipocampo. Em baixas concentrações, IL-1 β pode facilitar a potenciação a longo prazo (LTP) (CHAVES-FILHO *et al.*, 2019; YIRMIYA; GOSHEN, 2011). Porém, altos níveis dessa citocina prejudicam consistentemente o processo de LTP e memória dependentes do hipocampo e os processos de plasticidade sináptica associados, influenciando negativamente a neurogênese hipocampal, como foi demonstrado em estudos com animais (GOSHEN *et al.*, 2008; KOO; DUMAN, 2008; VEREKER; O'DONNELL; LYNCH, 2000). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) ajuda a proteger os neurônios de danos causados por infecção ou lesão, e desempenha um papel crítico em muitos dos processos de memória e plasticidade hipocampal comprometidos pela produção desregulada de IL-1 β , no entanto, em situações de estresse crônico, essa neurotrofina está com níveis diminuídos no hipocampo (LOPES *et al.*, 2018; PATTERSON, 2015).

Em conjunto, essas informações apontam para o que foi encontrado no presente trabalho. O ECI provocou nos animais um aumento nos níveis de IL-1 β , provavelmente em

decorrência da ativação microglial também elevada. Essa desregulação foi percebida nas respostas comportamentais alteradas exibidas pelos animais nos testes de memória. Ademais, RIP I e RIP II reduziram consideravelmente o nível de IL-1 β , mostrando sua capacidade de diminuir a neuroinflamação relacionada ao estresse. Ressalte-se que, como citado, sendo BDNF importante para a manutenção de funções neuronais e regulação dos danos causados pela exacerbação de IL-1 β , vale destacar que RIP I e RIP II foram capazes de elevar os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos a estresse induzido por administração crônica de corticosterona (LOPES *et al.*, 2018; MAIA OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A ativação microglial em conjunto com níveis elevados de IL-1 β apontam para uma relação existente entre esses dois fatores, visto que a principal fonte de IL-1 β cerebral é a micróglia, embora não seja a única. Além disso, a liberação dessa citonina pela micróglia é, predominantemente, dependente da ativação do inflamassoma NLRP3, podendo em parte, ser direcionado pela ativação do receptor P2X7, um canal iônico ativado por ATP, presente na micróglia. Esse mecanismo P2X7-NLRP3-IL1 β tem sido descrito como tendo importante papel na patogênese de desordens de humor (BHATTACHARYA; JONES, 2018; STOKES; SPENCER; JENKINS, 2015).

Os dados encontrados no presente trabalho de ativação microglial e níveis de IL-1 β aumentados em decorrência da exposição ao estresse crônico, bem como a demonstração dos efeitos comportamentais, em conjunto com a descrição na literatura do papel do mecanismo P2X7-NLRP3-IL-1 β em transtornos de humor motivaram a investigação dessa via como alvo de RIP I e RIP II. Partindo desse pressuposto, um ensaio *in silico* de *docking* molecular foi utilizado como ferramenta para avaliar a potencial interação entre RIP I e RIP II e as proteínas NLRP3, ASC e P2X7.

O inflamassoma NLRP3 é um dos mais importantes mecanismos pró-inflamatórios, que é regulado por PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*) e DAMPs (do inglês, *damage-associated molecular pattern*). Quando ativado, NLRP3 forma oligômeros e se liga a uma proteína acessória chamada ASC. Ambos então se ligam à pro-caspase-1, a qual é clivada em sua forma ativa, a caspase-1. Esta converte a pró-interleucina-1 β em interleucina-1 β (IL-1 β) que junto com citocinas e quimiocinas liberadas provocam resposta inflamatória em células neuronais adjacentes (KINRA *et al.*, 2021; SWANSON; DENG; TING, 2019). Desse modo, uma molécula capaz de inibir o inflamassoma NLRP3 seria útil no impedimento da neuroinflamação mediada por essa via. Até o presente, MCC950 é considerado um dos inibidores mais potentes e seletivos do inflamassoma NLRP3, e, embora

não disponível clinicamente, é comumente utilizado para fins experimentais (COLL *et al.*, 2019).

No presente estudo, na avaliação *in silico* da interação entre RIP I e RIP II com a proteína NLRP3, houve mínima diferença entre as energias de ligação de ambas (-7.7 Kcal/mol e -7.6 Kcal/mol, respectivamente). No entanto, RIP II apresentou uma ligação de hidrogênio a mais que RIP I. Estudos realizados com MCC950, um inibidor específico de NLRP3, mostraram que este ligou-se à proteína NLRP3 nos resíduos Arg335 por ligação de hidrogênio e Phe297 por ligação hidrofóbica do tipo *pi-stacking*, a qual refere-se à interação entre anéis aromáticos (LOWES *et al.*, 2021). Idênticas interações foram encontradas no nosso estudo com relação a RIP II, o que sugere sua capacidade de inibir NLRP3, provavelmente ao interagir com o domínio NACHT da proteína, visto que essa é a região na qual MCC950 exerce seus efeitos inibitórios (VANDE WALLE *et al.*, 2019). Um estudo *in silico* com fluoxetina, mostrou uma energia de ligação de -8.9 Kcal/mol para com NLRP3 (AMBATI *et al.*, 2021).

Sabe-se que a ativação do inflamassoma NLRP3 requer a interação, mediada por ASC, da proteína sensora NLRP3 com caspase-1. ASC interage com a proteína NLRP3 através de seu domínio de pirina (PYD) e recruta enzimas caspase através de seu domínio de ativação e recrutamento de caspase (CARD). Portanto, foi realizada também a investigação da ligação de RIP I e RIP II com a proteína ASC. Ao avaliar a interação de RIP I e RIP II com o domínio ASC, as energias de ligação com ambas as moléculas foram semelhantes (-6.0 Kcal/mol e -6.1 Kcal/mol), e ambas apresentaram interação com o resíduo Ser195, por ligação de hidrogênio, um importante resíduo ativo (DIAZ-PARGA; DE ALBA, 2019; NAMBAYAN *et al.*, 2019). RIP II, no entanto, apresentou mais duas ligações de hidrogênio com os resíduos His118 e Leu192. Diante do exposto, sugere-se que RIP I e principalmente RIP II podem exercer ação sobre ASC, mais provavelmente impedindo sua ligação com pro-caspase-1 (domínio CARD) do que impedindo sua ligação à proteína sensora NLRP3 (domínio PYD).

A liberação de IL-1 β pela micróglia via ativação do inflamassoma NLRP3 pode ter a participação de P2X7, um receptor purinérgico ativado por ATP presente em diversas células, incluindo a membrana microglial. O mecanismo ainda não está totalmente elucidado, porém ATP é considerado um sinal de perigo liberado de células estressadas ou danificadas para sinalizar danos às células imunes (FLESHNER; FRANK; MAIER, 2017; MARTÍNEZ-BANACLOCHA; PELEGRÍN, 2020; STOKES; SPENCER; JENKINS, 2015).

Estresse agudo e crônico, inclusive ECI, como utilizado neste trabalho, culminam com a liberação de ATP no hipocampo, concomitantemente com a ativação de NLRP3 e aumento

nos níveis de IL-1 β , sendo esses efeitos bloqueados pela administração de um antagonista de P2X7, o que sugere que a liberação de ATP induzida pelo estresse medeia a ativação do inflamassoma NLRP3 e subsequente liberação de IL-1 β (BHATTACHARYA, 2018; BHATTACHARYA; JONES, 2018; IWATA *et al.*, 2016; JIN; FLAVELL, 2010; KARMAKAR *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020; YUE *et al.*, 2017). Desse modo, a fim de investigar o mecanismo anti-neuroinflamatório de RIP I e RIP II em concomitância com o possível bloqueio de P2X7, os cálculos de *docking* molecular foram realizados também para este alvo protéico. RIP I e RIP II apresentaram energias de ligação semelhantes, porém RIP II apresentou duas ligações de hidrogênio a mais que RIP I. Além disso, RIP I apresentou interações hidrofóbicas nos resíduos Val312 e Phe103, os quais parecem ser parte do sítio de ligação de antagonistas de P2X7 (KARASAWA; KAWATE, 2016).

Diante dos resultados relevantes encontrados para RIP I e RIP II, prosseguiu-se com a predição farmacocinética para as duas moléculas.

As predições de ADME mostram que RIP I e RIP II apresentam absorção gastrointestinal e obedecem aos critérios de Lipinski, sem nenhuma violação: a) peso molecular ≤ 500 da; b) $\text{LogP} \leq 5$ (ou $\text{MLogP} \leq 4,15$); c) número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 ; d) número de doadores de pontes de hidrogênio ≤ 5 (LIPINSKI *et al.*, 2012). Esses critérios sugerem que a droga tem boa biodisponibilidade oral, sendo este um fator importante, visto que a via oral apresenta vantagens como a maior aceitação, maior segurança e baixo custo. Para tanto, a solubilidade em água é uma importante característica apresentada por ambas as moléculas, no entanto, RIP I parece apresentar leve vantagem em relação à RIP II. Ambas têm alta absorção gastrointestinal e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, como já esperado, visto que as alterações comportamentais e neuroquímicas foram comprovadas.

Além das propriedades físico-químicas, também foi realizada a predição das interações de RIP I e RIP II com as isoformas da enzima hepática citocromo P-450 (CYP), que são responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos. RIP I e RIP II mostraram-se possíveis inibidores de CYP1A2 e CYP2D6. A inibição enzimática pode prejudicar a biotransformação de fármacos, resultando em maiores níveis plasmáticos, e possível ocorrência de reações adversas (MANIKANDAN; NAGINI, 2018).

Fluoxetina e paroxetina também são inibidores de CYP2D6, e esse efeito deve ser levado em consideração para a determinação da dose farmacológica, visto que grandes concentrações do fármaco podem ficar disponíveis na circulação. Além disso, a utilização concomitante de outros fármacos pode ocasionar maior efeito destes, como descrito para o

uso concomitante de fluoxetina e risperidona, com risco aumentado de efeitos adversos extrapiramidais (LYNCH; NEFF, 2007).

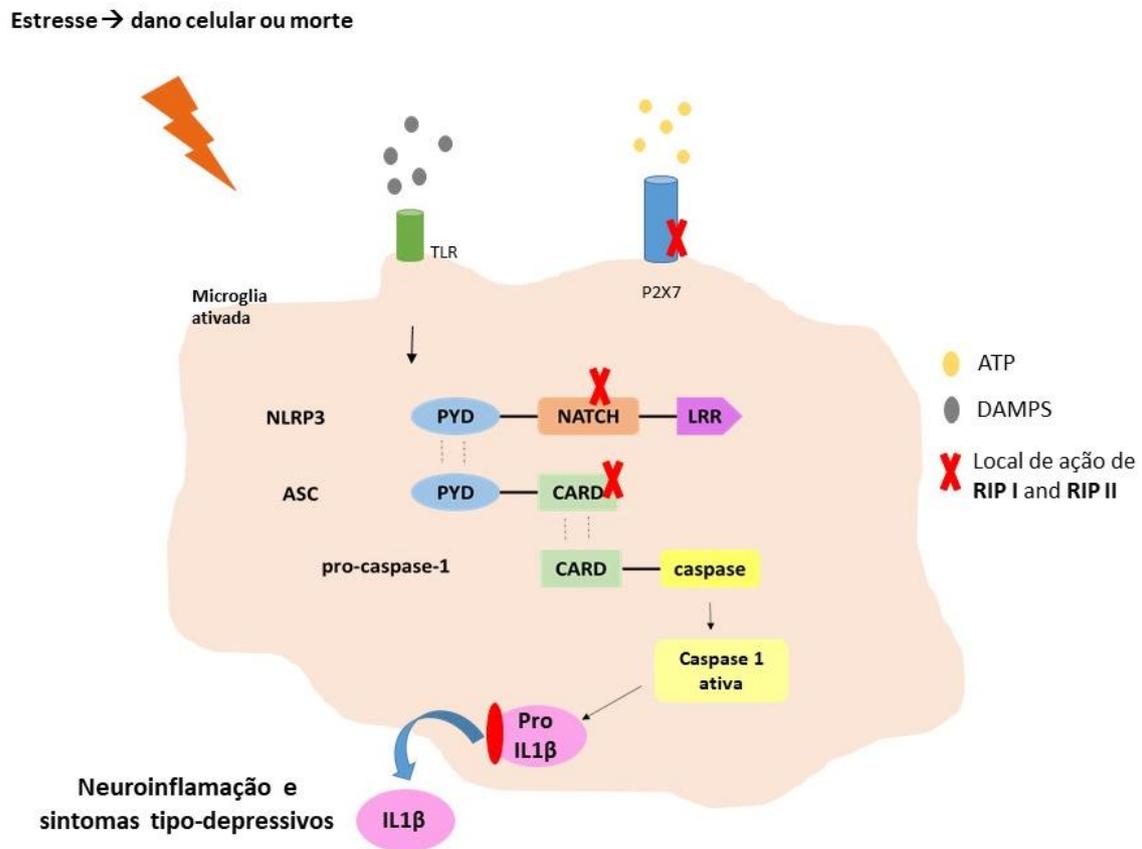
Além de CYP1A2 e CYP2D6, RIP I, mas não RIP II, mostrou-se como um provável inibidor de CYP2C19, enzima envolvida no metabolismo de xenobióticos, incluindo fármacos inibidores da bomba de prótons, anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da receptação da serotonina, como amitriptilina e citalopram. A inibição de CYP2C19 pode estar relacionada a um maior tempo de ação de fármacos, ou a impossibilidade de ativação de pró-fármacos (ALSANOSI; SKIFFINGTON; PADMANABHAN, 2014; TORNIO; BACKMAN, 2018).

RIP I e RIP II não são prováveis substratos da glicoproteína-P (gp-P), uma glicoproteína ligada à membrana, presente no fígado, rim, pâncreas, intestino, placenta e cérebro e responsável pelo transporte ativo de diversas substâncias para fora das células. Os compostos que são substratos da gp-P geralmente exibem baixa biodisponibilidade ou atividade MDR (fenômenos de resistência a múltiplos fármacos, *Multidrug Resistance*). A gp-P pode reduzir a resposta farmacológica de drogas, impedindo sua permeabilidade através de barreiras fisiológicas, alterando absorção, distribuição, metabolismo e excreção, por exemplo, lançando as moléculas para fora do lúmen gastrointestinal, ou impedindo a entrada de drogas no SNC (NGUYEN; DUONG; MAENG, 2021).

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados mostram o potencial antidepressivo de RIP I e RIP II, com efeitos benéficos sobre os comportamentos relativos a anedonia, interação social e desempenho cognitivo, frente à exposição a um estresse crônico. Esta capacidade está relacionada à inibição de mecanismos inflamatórios associados ao comportamento depressivo-símile, com destaque para a capacidade de reverter danos associados a alterações astrocíticas e microgliais. O mecanismo de ação proposto por meio de *docking* molecular parece estar relacionado à modulação da via P2X7-NLRP3-IL1 β , provavelmente nos domínios NATCH de NLRP3, CARD de ASC e P2X7, como corroborado pelas alterações visualizadas na atividade de células gliais e níveis hipocâmpais de citocinas. Esse é um dado promissor, que aponta para o benefício de uma ação antidepressiva mediante não apenas a alteração de funções monoaminérgicas, mas outros circuitos sabidamente envolvidos na fisiopatologia da depressão.

Considerando os achados do presente estudo, a figura 25 mostra uma proposta de possível mecanismo de ação de RIP I e RIP II.

Figura 25 – Possível mecanismo de ação de RIP I e RIP II



Fonte: elaborada pela autora.

A exposição a estresse pode causar liberação de DAMPS, as quais podem ativar o receptor TLR na membrana das células imunes do SNC, como micróglia. Além disso, o ATP liberado em grande concentração pode ativar o receptor P2X7, tendo como consequência a ativação do inflamassoma NLRP3. Sugere-se que RIP I e RIP II podem estar impedindo essa ativação ao se ligar no domínio NATCH da proteína NLRP3, no domínio CARD da proteína ASC (impedindo, assim, o recrutamento de caspase) e bloquear o receptor P2X7. Essas ações, em conjunto, podem culminar com a diminuição da liberação de IL-1 β madura, e consequentemente, com a diminuição da neuroinflamação, resultando em reversão dos sintomas tipo-depressivos.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que 28 dias de exposição ao Estresse Crônico Imprevisível (ECI) induziu um comportamento depressivo-símile em camundongos, evidenciado pelo aumento no tempo de imobilidade e a diminuição da preferência por sacarose. Os dados também demonstraram que RIP I e RIP II têm um semelhante potencial farmacológico de restaurar as alterações provocadas pelo estresse crônico. O mecanismo de ação proposto por meio de *docking* molecular parece estar relacionado à modulação do sistema P2X7-NLRP3-IL1 β , como demonstrado pelas alterações visualizadas na atividade de células gliais e níveis hipocâmpais de citocinas.

Esses resultados contribuem consideravelmente para o entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes ao efeito antidepressivo de RIP I e RIP II, as quais apresentam potencial farmacológico no aspecto da regulação dos níveis de citocinas e da ativação de células gliais, sendo, portanto, drogas inovadoras frente aos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento de depressão.

REFERÊNCIAS

- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 36, p. 111–117, fev. 2014.
- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Stress-Induced Depressive Behaviors Require a Functional NLRP3 Inflammasome. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 7, p. 4874–4882, set. 2016.
- ALKADHI, K. A.; TRAN, T. T. Chronic Stress Decreases Basal Levels of Memory-Related Signaling Molecules in Area CA1 of At-Risk (Subclinical) Model of Alzheimer’s Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 93–100, ago. 2015.
- ALSANOSI, S. M. M.; SKIFFINGTON, C.; PADMANABHAN, S. Chapter 17 - Pharmacokinetic Pharmacogenomics. In: PADMANABHAN, S. (Ed.). **Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 341–364.
- AMBATI, M. et al. Identification of fluoxetine as a direct NLRP3 inhibitor to treat atrophic macular degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 41, p. e2102975118, 12 out. 2021.
- ANDREWS, P. W. et al. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 51, p. 164–188, abr. 2015.
- 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, nov. 2012.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, maio 1973.
- ARIOZ, B. I. et al. Melatonin Attenuates LPS-Induced Acute Depressive-Like Behaviors and Microglial NLRP3 Inflammasome Activation Through the SIRT1/Nrf2 Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.
- AU, B. et al. The longitudinal associations between C-reactive protein and depressive symptoms: evidence from the English Longitudinal Study of Ageing (ELSA). **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 30, n. 9, p. 976–984, set. 2015.
- AYUOB, N. N. et al. Can *Ocimum basilicum* relieve chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice? **Experimental and Molecular Pathology**, v. 103, n. 2, p. 153–161, out. 2017.
- BAKUNINA, Nataliia; PARIANTE, Carmine M.; ZUNSZAIN, Patricia A.. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365–373, 10 jan. 2015.

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, maio 2010.

BARIK, J. et al. Chronic Stress Triggers Social Aversion via Glucocorticoid Receptor in Dopaminergic Neurons. **Science**, v. 339, n. 6117, p. 332–335, 18 jan. 2013.

BARROS, M. B. DE A. et al. Report on sadness/depression, nervousness/anxiety and sleep problems in the Brazilian adult population during the COVID-19 pandemic. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, 24 ago. 2020.

BASSETT, B. et al. Minocycline alleviates depression-like symptoms by rescuing decrease in neurogenesis in dorsal hippocampus via blocking microglia activation/phagocytosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 91, p. 519–530, jan. 2021.

BAUER, M. E.; TEIXEIRA, A. L. Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1437, n. 1, p. 57–67, fev. 2019.

BAUNE, B. T.; BRIGNONE, M.; LARSEN, K. G. A Network Meta-Analysis Comparing Effects of Various Antidepressant Classes on the Digit Symbol Substitution Test (DSST) as a Measure of Cognitive Dysfunction in Patients with Major Depressive Disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 97–107, 1 fev. 2018.

BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 234–256, jul. 2020.

BHATTACHARYA, A. Recent Advances in CNS P2X7 Physiology and Pharmacology: Focus on Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 30, 2018.

BHATTACHARYA, A.; JONES, D. N. C. Emerging role of the P2X7-NLRP3-IL1 β pathway in mood disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 98, p. 95–100, dez. 2018.

BLANDINO, P. et al. Gene expression changes in the hypothalamus provide evidence for regionally-selective changes in IL-1 and microglial markers after acute stress. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 7, p. 958–968, 1 out. 2009.

BLISS, T. **The hippocampus book**. New York, NY, US: Oxford University Press, 2007. p. 832

BORTOLATO, B. et al. The Involvement of TNF- α ; in Cognitive Dysfunction Associated with Major Depressive Disorder: An Opportunity for Domain Specific Treatments. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 5, p. 558–576, 13 out. 2015.

BOWLEY, M. P. et al. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 5, p. 404–412, set. 2002.

BUTLER, M. P.; O'CONNOR, J. J.; MOYNAGH, P. N. Dissection of tumor-necrosis factor- α inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early—but not late—phase LTP. **Neuroscience**, v. 124, n. 2, p. 319–326, jan. 2004.

CASSANO, P. et al. Inflammatory cytokines in major depressive disorder: A case-control study. **The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 23–31, jan. 2017.

CAVIEDES, A. et al. BDNF/NF- κ B Signaling in the Neurobiology of Depression. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 21, 30 ago. 2017.

CHAI, H. et al. Antidepressant Effects of Rhodomyrtone in Mice with Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 157–164, 1 fev. 2019.

CHANDLEY, M. J. et al. Gene expression deficits in pontine locus coeruleus astrocytes in men with major depressive disorder. **Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN**, v. 38, n. 4, p. 276–284, jul. 2013.

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

CHAVES, R. DE C. et al. The neuroprotective effect of Riparin IV on oxidative stress and neuroinflammation related to chronic stress-induced cognitive impairment. **Hormones and Behavior**, v. 122, p. 104758, jun. 2020.

CHAVES-FILHO, A. J. M. et al. Shared microglial mechanisms underpinning depression and chronic fatigue syndrome and their comorbidities. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 111975, out. 2019.

CHEN, F. et al. Hippocampal volume and cell number in depression, schizophrenia, and suicide subjects. **Brain research**, v. 1727, p. 146546, 1 jan. 2020.

CISNEROS-MEJORADO, A. et al. ATP signaling in brain: release, excitotoxicity and potential therapeutic targets. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 1, p. 1–6, jan. 2015.

COBB, J. A. et al. Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. **Journal of psychiatric research**, v. 47, n. 3, p. 299–306, mar. 2013.

COBB, J. A. et al. Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. **Neuroscience**, v. 316, p. 209–220, mar. 2016.

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

COLL, R. C. et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 6, p. 556–559, jun. 2019.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 mar. 2017.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W357–W364, 2 jul. 2019.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117–1121, 2016.

DE SOUSA, C. N. S. et al. Involvement of oxidative pathways and BDNF in the antidepressant effect of carvedilol in a depression model induced by chronic unpredictable stress. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 1, p. 297–311, jan. 2022.

DE SOUSA, F. C. F. et al. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 12, p. 1005–1008, dez. 2005.

DE SOUSA, F. C. F. et al. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1212–1216, jul. 2007.

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

DE SOUZA, A. G. et al. Neuroprotective effects of dimethyl fumarate against depression-like behaviors via astrocytes and microglia modulation in mice: possible involvement of the HCAR2/Nrf2 signaling pathway. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 4 jun. 2022.

DIAZ-PARGA, P.; DE ALBA, E. Protein interactions of the inflammasome adapter ASC by solution NMR. **Methods in enzymology**, v. 625, p. 223–252, 2019.

DONG, J. et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **Journal of Cheminformatics**, v. 10, n. 1, p. 29, 26 jun. 2018.

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

DUBELAAR, M. L. et al. The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. **Frontiers in Immunology**, v.9, p.1753, jul 2018.

DUBOVICKÝ, M. et al. Modulation of microglial function by the antidepressant drug venlafaxine 28 November 2014. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 201–207, 1 dez. 2014.

ELLER, T. et al. Pro-inflammatory cytokines and treatment response to escitalopram in major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 2, p. 445–450, fev. 2008.

ENACHE, D.; PARIANTE, C. M.; MONDELLI, V. Markers of central inflammation in major

depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of studies examining cerebrospinal fluid, positron emission tomography and post-mortem brain tissue. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 81, p. 24–40, out. 2019.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 244–254, dez. 2010.

ENNACEUR, A. Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 55–71, ago. 2014.

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, 1 nov. 1988.

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, jul. 2014.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 3, p. 138–145, mar. 2007.

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, 16 maio 2012.

FAROOQI, N. A. I. et al. Role of DHEA and cortisol in prefrontal-amygdalar development and working memory. **Psychoneuroendocrinology**, v. 98, p. 86–94, dez. 2018.

FAVA, M. et al. Difference in Treatment Outcome in Outpatients With Anxious Versus Nonanxious Depression: A STAR*D Report. **American Journal of Psychiatry**, v. 165, n. 3, p. 342–351, mar. 2008.

FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.

FLESHNER, M.; FRANK, M.; MAIER, S. F. Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 36–45, jan. 2017.

FRANK, M. G. et al. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, p. 191–200, fev. 2014.

GARBER, J.; WEERSING, V. R. Comorbidity of anxiety and depression in youth: Implications for treatment and prevention. **Clinical Psychology: Science and Practice**, v. 17, n. 4, p. 293–306, dez. 2010.

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.

GILHOTRA, N.; DHINGRA, D. GABAergic and nitriergic modulation by curcumin for its

antianxiety-like activity in mice. **Brain Research**, v. 1352, p. 167–175, set. 2010.

GITTINS, R. A.; HARRISON, P. J. A morphometric study of glia and neurons in the anterior cingulate cortex in mood disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 133, n. 1–2, p. 328–332, set. 2011.

GOSHEN, I. et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. **Molecular Psychiatry**, v. 13, n. 7, p. 717–728, jul. 2008.

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, set. 2014.

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 857–865, ago. 2008.

HARIJITH, A.; EBENEZER, D. L.; NATARAJAN, V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 352, 2014.

HAROON, E.; MILLER, A. H.; SANACORA, G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 193–215, jan. 2017.

HE, L.-W. et al. Optimization of food deprivation and sucrose preference test in SD rat model undergoing chronic unpredictable mild stress. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 69–78, 2020.

HERVÉ, M. et al. Translational Identification of Transcriptional Signatures of Major Depression and Antidepressant Response. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 248, 8 ago. 2017.

HOLSBOER, F. The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477–501, nov. 2000.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–856, ago. 2008.

HOVENS, I. B.; NYAKAS, C.; SCHOEMAKER, R. G. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. **Neuroimmunology and Neuroinflammation**, v. 1, p. 82–88, 28 ago. 2014.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, n. 2, p. 171–186, fev. 2009.

IWATA, M. et al. Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X₇ Receptor. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 12–22, 1 jul. 2016.

JESTE, P. D. V. et al. American Psychiatric Association. p. 992, [s.d.].

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 5, p. 628–631, set. 2010.

KAIDANOVICH-BEILIN, O. et al. Assessment of Social Interaction Behaviors. **Journal of Visualized Experiments**, n. 48, p. 2473, 25 fev. 2011.

KARASAWA, A.; KAWATE, T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. **eLife**, v. 5, p. e22153, 9 dez. 2016.

KARMAKAR, M. et al. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10555, 15 fev. 2016.

KATZ, R. J.; HERSH, S. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 265–271, jun. 1981.

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

KELLER, M. C.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. **The American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1521–1529; quiz 1622, out. 2007.

KINRA, M. et al. Inhibition of NLRP3-inflammasome mediated IL-1 β release by phenylpropanoic acid derivatives: in-silico and in-vitro approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 157, p. 105637, 1 fev. 2021.

KOO, J. W.; DUMAN, R. S. IL-1 is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 751–756, 15 jan. 2008.

KREISEL, T. et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 699–709, jun. 2014.

KWAK, Y. T.; YANG, Y.; KOO, M.-S. Depression and Cognition. **Dementia and Neurocognitive Disorders**, v. 15, n. 4, p. 103, 2016.

LENG, L. et al. Menin Deficiency Leads to Depressive-like Behaviors in Mice by Modulating Astrocyte-Mediated Neuroinflammation. **Neuron**, v. 100, n. 3, p. 551- 563.e7, nov. 2018.

LI, D. et al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. **Glia**, v. 68, n. 5, p. 878–897, maio 2020a.

LI, K. et al. Seahorse treatment improves depression-like behavior in mice exposed to CUMS through reducing inflammation/oxidants and restoring neurotransmitter and neurotrophin function. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, p. 112487, mar. 2020b.

- LI, L.-F. et al. Magnolol treatment reversed the glial pathology in an unpredictable chronic mild stress-induced rat model of depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 711, n. 1–3, p. 42–49, jul. 2013.
- LI, Y. et al. Isoliquiritin ameliorates depression by suppressing NLRP3-mediated pyroptosis via miRNA-27a/SYK/NF- κ B axis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, p. 1, 5 jan. 2021.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 1 mar. 2001.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, 1 dez. 2012.
- LIU, M.-Y. et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature Protocols**, v. 13, n. 7, p. 1686–1698, jul. 2018.
- LIU, Q. et al. Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. **European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 11, p. 796–805, nov. 2009.
- LIU, W. et al. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- LLERENA, K. et al. Social anhedonia and affiliation: Examining behavior and subjective reactions within a social interaction. **Psychiatry Research**, v. 200, n. 2–3, p. 679–686, dez. 2012.
- LOHNING, A. E. et al. A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 2023–2040, 2017.
- LOPES, I. S. et al. Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 33–42, nov. 2018.
- LOWES, D. J. et al. Identification of Dual-Target Compounds with Antifungal and Anti-NLRP3 Inflammasome Activity. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 8, p. 2522–2535, 13 ago. 2021.
- LU, Y. et al. Effects of vortioxetine and fluoxetine on the level of Brain Derived Neurotrophic Factors (BDNF) in the hippocampus of chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. **Brain Research Bulletin**, v. 142, p. 1–7, set. 2018.
- LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 523–532, nov. 1997.

LYNCH, T.; NEFF, A. P. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. **American Family Physician**, v. 76, n. 3, p. 391–396, 1 ago. 2007.

MAES, M. et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 27–53, mar. 2009.

MAES, M. et al. The new ‘5-HT’ hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 702–721, abr. 2011.

MAIA OLIVEIRA, I. C. et al. Neuroprotective and Antioxidant Effects of Riparin I in a Model of Depression Induced by Corticosterone in Female Mice. **Neuropsychobiology**, p. 1–11, 29 abr. 2021.

MALLMANN, A. S. V. et al. Is Riparin III a promising drug in the treatment for depression? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 162, p. 105824, jul. 2021.

MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 1, p. 38–54, 2018.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 1, p. 31–40, jan. 2007.

MARTÍNEZ-BANACLOCHA, H.; PELEGRÍN, P. Detection of Inflammasome Activation by P2X7 Purinoceptor Activation by Determining ASC Oligomerization. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2041, p. 335–343, 2020.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 229–265, 2009.

MASI, G.; BROVEDANI, P. The Hippocampus, Neurotrophic Factors and Depression: Possible Implications for the Pharmacotherapy of Depression. **CNS Drugs**, v. 25, n. 11, p. 913–931, nov. 2011.

MASLANIK, T. et al. The inflammasome and danger associated molecular patterns (DAMPs) are implicated in cytokine and chemokine responses following stressor exposure. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 28, p. 54–62, fev. 2013.

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

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, 15 mar. 2017.

- MÉNARD, C.; HODES, G. E.; RUSSO, S. J. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. **Neuroscience**, Animal Models of Neuropsychiatric Disease. v. 321, p. 138–162, 3 maio 2016.
- MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, mar. 2011.
- 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, jan. 2016.
- MORRIS, S. E.; CUTHBERT, B. N. Research Domain Criteria: cognitive systems, neural circuits, and dimensions of behavior. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 29–37, mar. 2012.
- MOY, S. S. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 3, n. 5, p. 287–302, out. 2004.
- NAGY, C. et al. Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 3, p. 320–328, mar. 2015.
- NAMBAYAN, R. J. T. et al. The inflammasome adapter ASC assembles into filaments with integral participation of its two Death Domains, PYD and CARD. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 2, p. 439–452, 11 jan. 2019.
- NGUYEN, T.-T.-L.; DUONG, V.-A.; MAENG, H.-J. Pharmaceutical Formulations with P-Glycoprotein Inhibitory Effect as Promising Approaches for Enhancing Oral Drug Absorption and Bioavailability. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 1103, jul. 2021.
- NOLLET, M. Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice. **Current Protocols**, v. 1, n. 8, ago. 2021.
- 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, jan. 2018.
- ONGUR, D.; DREVETS, W. C.; PRICE, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13290–13295, 27 out. 1998.
- ORTIZ, J. B. et al. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor mediates recovery from chronic stress-induced spatial reference memory deficits. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 9, p. 3351–3362, nov. 2014.
- OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 2, p. 16065, 15 set. 2016.
- OUDE VOSHAAR, R. C. et al. Suicide in late-life depression with and without comorbid anxiety disorders: Suicide in late-life depression-anxiety comorbidity. **International Journal**

of **Geriatric Psychiatry**, v. 31, n. 2, p. 146–152, fev. 2016.

PACE, T. W. W.; HU, F.; MILLER, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: Relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2007.

PAN, Y. et al. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 41, p. 90–100, out. 2014.

PAN, Z. et al. Cognitive impairment in major depressive disorder. **CNS spectrums**, v. 24, n. 1, p. 22–29, fev. 2019.

PAPALEO, F. et al. Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. **Learning & Memory**, v. 18, n. 8, p. 534–544, ago. 2011.

PARK, C. et al. Stress, epigenetics and depression: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 139–152, jul. 2019.

PATEL, P. The Efficacy of Antidepressants in Alleviating Anhedonia in Depressed Patients. p. 28, 2016.

PATTERSON, S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 11–18, set. 2015.

PAXINOS, G., FRANKLIN, K. **Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates - 5th Edition**. Elsevier Science, 2019.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, fev. 1978.

PRICE, R. B.; DUMAN, R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 3, p. 530–543, mar. 2020.

PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, v. 302, p. 2–22, ago. 2015.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, fev. 2003.

PRYCE, C. R.; FONTANA, A. Depression in Autoimmune Diseases. In: DANTZER, R.; CAPURON, L. (Eds.). **Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications**. Current Topics in Behavioral Neurosciences. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 139–154.

QUIROGA, R.; VILLARREAL, M. A. Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening. **PloS One**, v. 11, n. 5, p. e0155183, 2016.

- RAISON, Charles L. et al. A Randomized Controlled Trial of the Tumor Necrosis Factor Antagonist Infliximab for Treatment-Resistant Depression. **Jama Psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 31, 1 jan. 2013.
- RAISON, C. L.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 1, p. 24–31, jan. 2006.
- RAJKOWSKA, G.; STOCKMEIER, C. Astrocyte Pathology in Major Depressive Disorder: Insights from Human Postmortem Brain Tissue. **Current Drug Targets**, v. 14, n. 11, p. 1225–1236, 1 set. 2013.
- 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, 7 dez. 2012.
- RONCALHO, A. L. **Participação da via P2X7-Inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse**. Doutorado em Farmacologia—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 29 abr. 2022.
- ROSENBLAT, J. D.; KAKAR, R.; MCINTYRE, R. S. The Cognitive Effects of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 2, p. pyv082, fev. 2016.
- SANACORA, G.; BANASR, M. From Pathophysiology to Novel Antidepressant Drugs: Glial Contributions to the Pathology and Treatment of Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1172–1179, jun. 2013.
- SANDI, C.; HALLER, J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 290–304, maio 2015.
- SANTELLO, M.; BEZZI, P.; VOLTERRA, A. TNF α Controls Glutamatergic Gliotransmission in the Hippocampal Dentate Gyrus. **Neuron**, v. 69, n. 5, p. 988–1001, mar. 2011.
- SANTIAGO, A. R. et al. Microglia in Health and Disease: A Double-Edged Sword. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. e7034143, 10 set. 2017.
- SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 4, p. 491–495, 1988.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 52434, 6 fev. 2015.
- SETIAWAN, E. et al. Role of Translocator Protein Density, a Marker of Neuroinflammation, in the Brain During Major Depressive Episodes. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 268, 1 mar. 2015.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry : AABC**, v. 7, p. 23–36, 2 set. 2014.

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, 1p following 602, maio 2010.

SIEGMANN, E.-M. et al. Association of Depression and Anxiety Disorders With Autoimmune Thyroiditis: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA psychiatry**, v. 75, n. 6, p. 577–584, 1 jun. 2018.

SILVEIRA, Alethéia Lacerda da. **TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DOS ANÁLOGOS DAS RIPARINAS I, II E III UTILIZANDO MODELOS IN VITRO**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

SLAVICH, G. M.; IRWIN, M. R. From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression. **Psychological bulletin**, v. 140, n. 3, p. 774–815, maio 2014.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, jan. 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, set. 2009.

SONG, W. et al. Ginsenoside compound K inhibits oxidative stress and NLRP3 inflammasome activity in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 1372–1379, 1 jan. 2019.

SPELLMAN, T. et al. Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 309–314, jun. 2015.

STEINER, J. et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. **Journal of Psychiatric Research**, v. 42, n. 2, p. 151–157, jan. 2008.

STOKES, L.; SPENCER, S. J.; JENKINS, T. A. Understanding the role of P2X7 in affective disorders—are glial cells the major players? **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 8 jul. 2015.

SU, W.-J. et al. NLRP3 gene knockout blocks NF- κ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model. **Behavioural Brain Research**, v. 322, n. Pt A, p. 1–8, 30 mar. 2017.

SUBRAMANIAM, S. R.; FEDEROFF, H. J. Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 176, 8

jun. 2017.

SUGAMA, S.; KAKINUMA, Y. Stress and brain immunity: Microglial homeostasis through hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis and sympathetic nervous system. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 7, p. 100111, ago. 2020.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews. Immunology**, v. 19, n. 8, p. 477–489, ago. 2019.

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

TONG, L. et al. Microglia Loss Contributes to the Development of Major Depression Induced by Different Types of Chronic Stresses. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 10, p. 2698–2711, out. 2017.

TORNIO, A.; BACKMAN, J. T. Chapter One - Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. In: BRØSEN, K.; DAMKIER, P. (Eds.). **Advances in Pharmacology**. Pharmacogenetics. [s.l.] Academic Press, 2018. v. 83p. 3–32.

TORRES-BERRÍO ET AL. Unraveling the epigenetic landscape of depression: focus on early life stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 341–357, dez. 2019.

TREADWAY, M. T.; ZALD, D. H. Reconsidering anhedonia in depression: Lessons from translational neuroscience. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 537–555, jan. 2011.

TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151–171, jan. 2021.

TYNAN, R. J. et al. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 7, p. 1058–1068, out. 2010.

UHER, R. et al. An inflammatory biomarker as a differential predictor of outcome of depression treatment with escitalopram and nortriptyline. **The American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 12, p. 1278–1286, 1 dez. 2014.

VANDE WALLE, L. et al. MCC950/CRID3 potently targets the NACHT domain of wild-type NLRP3 but not disease-associated mutants for inflammasome inhibition. **PLoS biology**, v. 17, n. 9, p. e3000354, set. 2019.

VEREKER, E.; O'DONNELL, E.; LYNCH, M. A. The Inhibitory Effect of Interleukin-1 β on Long-Term Potentiation Is Coupled with Increased Activity of Stress-Activated Protein Kinases. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. 6811–6819, 15 set. 2000.

VINCKIER, F.; GOURION, D.; MOUCHABAC, S. Anhedonia predicts poor psychosocial

functioning: Results from a large cohort of patients treated for major depressive disorder by general practitioners. **European Psychiatry**, v. 44, p. 1–8, jul. 2017.

VOLONTÉ, C. et al. P2X7 receptors: channels, pores and more. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 11, n. 6, p. 705–721, set. 2012.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 626–640, ago. 2005.

WANG, D. et al. P2X7 receptor mediates NLRP3 inflammasome activation in depression and diabetes. **Cell & Bioscience**, v. 10, p. 28, 5 mar. 2020.

WANG, G. et al. Cognitive symptoms in major depressive disorder: associations with clinical and functional outcomes in a 6-month, non-interventional, prospective study in China. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. Volume 15, p. 1723–1736, jul. 2019.

WANG, K. et al. TNF- α promotes extracellular vesicle release in mouse astrocytes through glutaminase. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 87, dez. 2017a.

WANG, Q. et al. An astroglial basis of major depressive disorder? An overview: WANG et al. **Glia**, v. 65, n. 8, p. 1227–1250, ago. 2017b.

WANG, Y.-L. et al. Catalpol ameliorates depressive-like behaviors in CUMS mice via oxidative stress-mediated NLRP3 inflammasome and neuroinflammation. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 353, 8 jun. 2021.

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. 358–364, 1987.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319–329, 10 dez. 1997.

WILLNER, P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 68–77, 22 ago. 2016.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, SI:Stressors in animals. v. 6, p. 78–93, 1 fev. 2017.

WU, Z. et al. Difference in remission in a Chinese population with anxious versus nonanxious treatment-resistant depression: A report of OPERATION study. **Journal of Affective Disorders**, v. 150, n. 3, p. 834–839, set. 2013.

XUE, J. et al. l-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 134, p. 42–48, jul. 2015.

YANG, L. et al. The Effects of Psychological Stress on Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 4, p. 494–504, 31 ago. 2015.

YAO, Z. et al. Electroacupuncture alleviated the depression-like behavior by regulating FGF2 and astrocytes in the hippocampus of rats with chronic unpredictable mild stress. **Brain Research Bulletin**, v. 169, p. 43–50, abr. 2021.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 181–213, fev. 2011.

YIRMIYA, R.; RIMMERMAN, N.; RESHEF, R. Depression as a Microglial Disease. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 10, p. 637–658, out. 2015.

YUE, N. et al. Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 102, 10 maio 2017.

YUSUF, D. et al. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 1 jul. 2008.

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, jan. 2019.

ZHANG, Y. et al. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 119–124, fev. 2014.

ZUNSZAIN, P. A. et al. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 722–729, 29 abr. 2011.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO NA CEUA



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do efeito de riparin II sobre déficit de memória e resposta inflamatória em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível moderado", protocolada sob o CEUA nº 7608051018 (00000001), sob a responsabilidade de **Francisca Cléa Florenço de Sousa** e equipe; Iara Ja Stéfane Lopes - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 20/11/2018.

We certify that the proposal "Investigation of the effect of riparin II on memory deficit and inflammatory response in mice submitted to the model of depression induced by chronic unpredictable mild stress", utilizing 192 Heterogenics mice (192 males), protocol number CEUA 7608051018 (00000001), under the responsibility of **Francisca Cléa Florenço de Sousa** and team; Iara Ja Stéfane Lopes - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 11/20/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 11/2018 a 07/2021

Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **192**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **22 a 26 g**

Local do experimento: Os animais serão mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) localizado na Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE. O protocolo experimental será realizado em salas de experimentação adequadas para o manuseio de animais, sem ruídos e devidamente higienizadas, mantendo as condições de temperatura e ciclo claro/escuro anteriormente descritos. Os testes comportamentais serão executados em sala também apropriada (com as mesmas condições) e aparatos de acrílico para execução dos testes. Os aparatos serão limpos depois de cada animal. A eutanásia será executada em sala separada, isolada do ambiente de alojamento dos animais, impedindo a passagem de ruídos e odores.

Fortaleza, 09 de maio de 2020

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

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