



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO DERIVADO PIPERAZÍNICO 2,6-
di-*terc*-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1-*i*/)metil)fenol (LQFM212)
E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS**

LORRANE KELLE DA SILVA MOREIRA

GOIÂNIA-GO

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Lorrane Kelle da Silva Moreira

3. Título do trabalho

Efeito tipo-antidepressivo do derivado piperazínico 2,6-di-terc-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il)metil)fenol (LQFM212) e possíveis mecanismos de ação envolvidos

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Elson Alves Costa, Professor do Magistério Superior**, em 16/03/2023, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lorrane Kelle Da Silva Moreira, Discente**, em 16/03/2023, às 15:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3602227** e o código CRC **8619B762**.

Referência: Processo nº 23070.007986/2023-15

SEI nº 3602227

LORRANE KELLE DA SILVA MOREIRA

**EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO DERIVADO PIPERAZÍNICO 2,6-di-*terc*-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1-*il*))metil)fenol (LQFM212)
E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Elson Alves Costa

GOIÂNIA-GO

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Moreira, Lorrane Kelle da Silva
EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO DERIVADO
PIPERAZÍNICO 2,6-di-terc-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1
il)metil)fenol (LQFM212) E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO
ENVOLVIDOS [manuscrito] / Lorrane Kelle da Silva Moreira. - 2023.
xii, 113 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Elson Alves Costa.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2023.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. depressão. 2. piperazina. 3. monoaminas. 4. fatores
neurotróficos. 5. lipopolissacarídeo. I. Costa, Elson Alves, orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 114 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que confere a **Lorrane Kelle da Silva Moreira** o título de Doutora em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de 2023, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “Efeito tipo-antidepressivo do derivado piperazínico 2,6-di-terc-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il)metil)fenol (LQFM212) e possíveis mecanismos de ação envolvidos”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Elson Alves Costa (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Fábio Fagundes da Rocha (UFRRJ), membro titular externo; Professora Doutora Pablinny Moreira Galdino de Carvalho (UFOB), membro titular externo; Professor James Oluwagbamigbe Fajemiroye (ICB - UFG), membro titular interno; Professor Doutor Paulo César Ghedini (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprova**da pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Elson Alves Costa, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de 2023.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Pablinny Moreira Galdino de Carvalho, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo César Ghedini, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Fagundes da Rocha, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **James Oluwagbamigbe Fajemiroye, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elson Alves Costa, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

Assinatura [acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3543876** e o código CRC .

Dedicatória

A minha família, em especial,
meu esposo Luã e minha filha Lana!

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus, por me permitir trilhar este caminho dia após dia.

A minha família, mãe, irmã, avó e tios que sempre me apoiaram, incentivaram e se orgulham por tudo que já conquistei até aqui. Obrigada por torcerem pelo meu sucesso e por toda oração pela minha vida.

A minha família particular, meu esposo e minha filha que são meu porto seguro, lar e refrigerio.

As minhas amigas queridas, Géssica e Thuana, companheiras de pós-graduação e da vida. Tê-las por perto deixou a caminhada mais leve e prazerosa.

Ao meu orientador, professor Elson Alves Costa – nosso Xico, por toda confiança a mim depositada, pela amizade, parceria e por ter sido ao longo desses anos muito mais que orientador. Sempre levarei comigo as longas e prazerosas conversas, conselhos e histórias contadas e vivenciadas. Obrigada por me ensinar a ter pensamento crítico, pelo seu exemplo e cuidado com a ciência e a docência.

Aos professores, Ricardo Menegatti e James Fajemiroye, por todo auxílio, parceria e disponibilidade constante para compartilhar conhecimento.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos que tive o prazer de conhecer, conviver e superar dificuldades juntos. Esse trabalho não seria o mesmo sem vocês.

A Capes pelo auxílio financeiro e a Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de formação concedida a mim e a tantas outras pessoas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XX
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE.....	XXII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais dos transtornos depressivos	1
1.2 Neurobiologia dos transtornos depressivos.....	5
1.2.1 Hipótese monoaminérgica	8
1.2.2 Hipótese neurotrófica	10
1.2.3 Hipótese neuroinflamatória.....	12
1.3 Tratamento farmacológico dos transtornos depressivos	17
1.4 Derivados piperazínicos	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Desenho experimental.....	22
3.3 Fármacos e reagentes.....	23
3.4 Avaliação da atividade tipo-antidepressiva.....	24
3.4.1 Teste do nado forçado.....	24
3.4.2 Envolvimento das vias monoaminérgicas.....	25
3.4.2.1 Participação dos receptores serotoninérgicos	25

3.4.2.2 Participação da serotonina endógena	26
3.4.2.3 Participação dos receptores noradrenérgicos	26
3.4.2.4 Participação dos receptores dopaminérgicos	26
3.4.2.5 Participação das catecolaminas endógenas	26
3.4.3 Quantificação dos níveis hipocampais de BDNF	27
3.4.4 Avaliação de possíveis alterações indicativas de efeitos adversos	28
3.4.4.1 Quantificação dos níveis de GSH no fígado	28
3.4.4.2 Determinação de indicadores da função hepática e renal	28
3.5 Modelo de neuroinflamação induzida por LPS	29
3.6 Avaliação comportamental no modelo de neuroinflamação	30
3.6.1 Teste do campo aberto	30
3.6.2 Teste do nado forçado	30
3.6.3 Teste da suspensão pela cauda	30
3.7. Modelo de pleurisia induzido por carragenina ou LPS	31
3.8. Avaliação bioquímica após modelos de neuroinflamação e pleurisia	31
3.8.1 Dosagens de citocinas pró e anti-inflamatórias	32
3.8.2 Atividade da enzima MPO	32
3.8.3 Níveis de nitritos	33
3.8.4 Níveis de GSH	33
3.8.5 Atividade da enzima ChE	34
3.7 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Avaliação da atividade tipo-antidepressiva	35
4.1.1 Teste do nado forçado	35
4.1.2 Envolvimento das vias monoaminérgicas	38
4.1.2.1 Participação dos receptores serotoninérgicos	38
4.1.2.2 Participação da serotonina endógena	38

4.1.2.3 Participação dos receptores noradrenérgicos	41
4.1.2.4 Participação dos receptores dopaminérgicos	44
4.1.2.5 Participação das catecolaminas endógenas	47
4.1.3 Quantificação dos níveis hipocampais de BDNF.....	49
4.1.4 Avaliação de possíveis alterações indicativas de efeitos adversos	50
4.2 Avaliação comportamental no modelo de neuroinflamação	52
4.2.1 Teste do campo aberto.....	52
4.2.2 Teste do nado forçado.....	54
4.2.3 Teste da suspensão pela cauda.....	56
4.3 Modelo de pleurisia induzido por carragenina ou LPS.....	58
4.4 Avaliação bioquímica após os modelos de neuroinflamação e pleurisia	60
4.4.1 Dosagens de citocinas pró e anti-inflamatórias	60
4.4.2 Atividade da enzima MPO	63
4.4.3 Níveis de nitritos	65
4.4.4 Níveis de GSH.....	66
4.4.5 Atividade da enzima ChE	68
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO I - Parecer da comissão de ética em uso de animais (CEUA) da UFG.....	109
ANEXO II - Comprovante de aprovação da patente de LQFM212.....	110
ANEXO III - Artigo publicado com parte dos resultados referentes a tese	111
ANEXO IV - Artigo publicado com parte dos resultados referentes a tese	112
ANEXO V - Artigo publicado com resultados paralelos ao doutorado	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%CrCentro	Porcentagem de linhas cruzadas na área central do campo aberto
%TCentro	Porcentagem de tempo despendido na área central do campo aberto
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT _{1A}	Receptor serotoninérgico subtipo 1A
AChE	Acetilcolinesterase
ADT	Antidepressivos tricíclicos
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPT	α -metil- <i>p</i> -tirosina
ANOVA	Análise de Variância
APA	<i>American Psychiatric Association</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i>
CA	Campo aberto
CCE	Caixa claro-escuro
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
ChE	Colinesterase
CPF	Córtex pré-frontal
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DA	Dopamina
DAT	<i>Dopamine transporter</i>
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition</i>
DTNB	5,5-dithio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA _A	Receptor GABAérgico subtipo A
GBD	<i>Global Burden of Disease Study</i>

GSH	Glutathiona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon gama
IHME	<i>Institute for Health Metrics and Evaluation</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMAO	Inibidores da monoamino oxidase
IRMA	Inibidores reversíveis da MAO-A
IRSN	Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LPS	Lipopolissacarídeo
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
LQFM212	2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il)metil)fenol
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
MAO	Monoamino oxidase
MAO-A	Monoamino oxidase - isoforma A
MAO-B	Monoamino oxidase - isoforma B
MCPD	Matéria cinzenta periaquedutal
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NE	Noradrenalina
NF	Nado forçado
NF- κ B	<i>Nuclear fator kappa B</i>
NMDA	N-metil-D-Aspartato
PCPA	para-clorofenilalanina
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
SERT	<i>Serotonin transporter</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPC	Suspensão pela cauda
TDM	Transtorno depressivo maior

TDP	Transtorno depressivo persistente
Th1	Células <i>T helper</i> 1
Th2	Células <i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TLR4	<i>Toll-like receptors 4</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TrkB	Receptor de tropomiosina quinase B
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência global dos transtornos depressivos entre os anos de 1990-2019.....	1
Figura 2. Hipótese monoaminérgica dos transtornos depressivos.....	9
Figura 3. Hipótese neurotrófica dos transtornos depressivos.....	11
Figura 4. Efeitos centrais causados por citocinas pró-inflamatórias.....	14
Figura 5. Comportamento depressivo causado por descompensação de mecanismos que regulam o comportamento doentio.....	16
Figura 6. Estrutura química do derivado piperazínico LQFM212.....	20
Figura 7. Representação esquemática do modelo de neuroinflamação induzida por LPS.....	29
Figura 8. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 µmol/kg) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral.....	36
Figura 9. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 µmol/kg) no teste do nado forçado após 15 dias de tratamento por via oral (1x ao dia)	37
Figura 10. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 µmol/kg) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT _{1A} , WAY-100635 (0,71 µmol/kg)	39
Figura 11. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 µmol/kg) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do inibidor da enzima triptofano hidroxilase, PCPA (500 µmol/kg)	40
Figura 12. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 µmol/kg) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista do receptor α ₁ -adrenérgico, prazosina (2,6 µmol/kg)	42

Figura 13. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral na ausência ou na presença do antagonista não-seletivo do receptor β -adrenérgico, propranolol (7,8 $\mu\text{mol/kg}$)	43
Figura 14. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista do receptor dopaminérgico D ₁ , SCH-23390 (15 $\mu\text{g/kg}$)	45
Figura 15. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista dos receptores dopaminérgicos D ₂ e D ₃ , sulpirida (146 $\mu\text{mol/kg}$)	46
Figura 16. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do inibidor da enzima tirosina hidroxilase, AMPT (512 $\mu\text{mol/kg}$)	48
Figura 17. Níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo de camundongos tratados por via oral com veículo, LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) ou imipramina (54 $\mu\text{mol/kg}$)	49
Figura 18. Efeito da administração oral com veículo, LQFM212 ou imipramina por 15 dias no peso corporal dos camundongos.....	50
Figura 19. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) após a administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg) no teste do campo aberto.....	53
Figura 20. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) após a administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg) no teste do nado forçado.....	55
Figura 21. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) após a administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg) no teste de suspensão pela cauda.....	57

Figura 22. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 μ mol/kg) sobre os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no soro de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg)	61
Figura 23. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 μ mol/kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no exsudato pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina 1% ou LPS (250 ng/mL)	63
Figura 24. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 μ mol/kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no córtex pré-frontal ou hipocampo de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg)	64
Figura 25. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 μ mol/kg) sobre os níveis de nitritos no córtex pré-frontal ou hipocampo de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg)	66
Figura 26. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 μ mol/kg) sobre os níveis glutatona no córtex pré-frontal ou hipocampo de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg)	67
Figura 27. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 μ mol/kg) sobre a atividade da colinesterase no cérebro de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg)	68

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Classificação dos transtornos depressivos.....	3
Tabela 1. Efeito da administração oral com veículo, LQFM212 ou imipramina por 15 dias nos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais dos camundongos.....	51
Tabela 2. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) sobre a migração celular no exsudato pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS.....	59
Tabela 3. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) sobre os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no exsudato pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS.....	62

RESUMO

Os transtornos depressivos atingem indivíduos em todo o mundo e podem se apresentar em comorbidade com outros distúrbios mentais, como os transtornos de ansiedade. Apesar dos avanços para melhorar a compreensão da neurobiologia dos transtornos depressivos, nenhum mecanismo já proposto *per se* pode explicar todas as facetas desses transtornos e os fármacos disponíveis mostram frequentemente um atraso terapêutico para a eficácia clínica. Uma variedade de resultados mostra os efeitos de derivados piperazínicos no sistema nervoso central, e são, dessa forma, indicadores do potencial terapêutico destes derivados para o tratamento de distúrbios mentais. Anteriormente, foi mostrado que o derivado piperazínico 2,6-di-*terc*-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazin-1-*il*)/metil)fenol (LQFM212) apresenta atividade-tipo ansiolítica em camundongos, envolvendo vias serotoninérgicas, receptores nicotínicos e sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, sem levar a alterações na função cognitiva. Neste contexto, sabendo que um mesmo composto pode apresentar efeitos ansiolíticos bem como antidepressivos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível atividade tipo-antidepressiva do composto LQFM212. Camundongos machos albinos *Swiss* tratados por via oral com LQFM212 (54 µmol/kg) mostraram efeitos comportamentais relacionados a atividade tipo-antidepressiva, no teste do nado forçado (TNF), após tratamento com dose única ou com doses repetidas por 15 dias consecutivos. O pré-tratamento com WAY-100635 (0,7 µmol/kg), *p*-clorofenilalanina (500 µmol/kg), prazosina (2,6 µmol/kg), SCH-23390 (15 µg/kg), sulpirida (146 µmol/kg) ou α -metil-*p*-tirosina (512 µmol/kg) reverteu o efeito tipo-antidepressivo de LQFM212 no TNF. Além disso, o tratamento com doses repetidas com LQFM212 aumentou os níveis hipocâmpais do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Em relação ao monitoramento do peso corporal e a avaliação de possíveis alterações bioquímicas o tratamento com doses repetidas com LQFM212 (54 µmol/kg) não alterou: peso corporal dos animais, níveis de glutatona (GSH) no fígado, níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina. Uma possível ação do composto LQFM212 sob parâmetros inflamatórios, em camundongos, foi avaliada por inflamação sistêmica pelo modelo de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e por inflamação local pelo modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS. No modelo de neuroinflamação induzida por LPS, o tratamento oral com LQFM212 (54 µmol/kg) reverteu as alterações comportamentais nos testes de

campo aberto, nado forçado e suspensão pela cauda, o aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e a redução sérica de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) causados pela administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg). Neste mesmo modelo, o tratamento com LQFM212 (54 μ mol/kg) também atenuou as alterações relacionadas ao estresse oxidativo, demonstrado pela redução dos níveis de nitritos e da atividade da mieloperoxidase (MPO), e aumento dos níveis de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo, além disso também reduziu a atividade da colinesterase no cérebro total, dos animais que receberam administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg). Por outro lado, o tratamento oral com LQFM212 (54 μ mol/kg) não conseguiu reduzir o aumento da migração celular e das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no exsudato pleural causados pela administração intrapleural de carragenina a 1% ou LPS (250 ng/mL) no modelo de pleurisia. Além da redução da atividade da MPO vista no modelo de neuroinflamação induzida por LPS, o tratamento com LQFM212 (54 μ mol/kg) também reduziu a atividade desta enzima no exsudato pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS. Em conjunto, os resultados mostraram que o tratamento com LQFM212 promove alterações comportamentais sugestivas de atividade tipo-antidepressiva em camundongos, que provavelmente envolvem as vias monoaminérgicas, além de aumento dos níveis hipocámpais de BDNF, sugerindo mudanças na neuroplasticidade sináptica possivelmente como um mecanismo subjacente ao efeito tipo-antidepressivo do composto. Os efeitos encontrados no modelo de neuroinflamação induzida por LPS não parecem ser secundários a uma ação anti-inflamatória periférica de LQFM212, visto que este composto não conseguiu reduzir as alterações causadas pela carragenina ou LPS no modelo de pleurisia. Por outro lado, o tratamento com LQFM212 reduziu a atividade da enzima MPO no exsudato pleural, córtex pré-frontal e hipocampo, além de aumentar *per se* os níveis de GSH em ambas as regiões cerebrais mencionadas acima, sugerindo dessa forma uma possível atividade antioxidante *in vivo* que pode, portanto, contribuir para os efeitos observados no modelo de neuroinflamação e de pleurisia.

Palavras-chave: depressão; piperazina; monoaminas; fatores neurotróficos; lipopolissacarídeo; citocinas.

ABSTRACT

Depressive disorders affect individuals worldwide and may also be associated with other mental disorders such as anxiety disorders. Despite advances to improve understanding of the neurobiology of depressive disorders, no single established mechanism *per se* can explain all facets of these disorders and the available drugs often show therapeutic delay for clinical effectiveness. A plethora of results show the effects of piperazine derivatives on the central nervous system and are indicators of its therapeutic potential for treating mental disorders. Previously, it was shown that the piperazine derivative 2,6-di-*tert*-butyl-4-((4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol (LQFM212) has anxiolytic-like activity which involves serotonergic pathway, nicotinic receptors and BZD-site of GABA_A receptor, without cognitive impairments. In this regard, since the same compound can have anxiolytic as well as antidepressant effects, the aim of this research was to evaluate the possible antidepressant-like activity of the compound LQFM212. Swiss albino male mice orally treated with LQFM212 (54 µmol/kg) showed behavioral effects related to antidepressant-like activity, in the forced swimming test (FST), after treatment with a single dose or with repeated doses for 15 consecutive days. Pretreatment with WAY-100635 (0.7 µmol/kg), *p*-chlorophenylalanine (500 µmol/kg), prazosin (2.6 µmol/kg), SCH-23390 (15 µg/kg), sulpiride (146 µmol/kg) ou α -methyl-*p*-tyrosine (512 µmol/kg) reversed the antidepressant-like effect of LQFM212 in the FST. Furthermore, repeated treatment with LQFM212 increased hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. Regarding the monitoring of body weight and the evaluation of possible biochemical changes the treatment with repeated doses with LQFM212 (54 µmol/kg) did not change: animals' body weight, liver glutathione (GSH) levels, and serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine. A possible action of the compound LQFM212 on inflammatory parameters, in mice, was evaluated by systemic inflammation by the lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation model and by local inflammation by the carrageenan- or LPS-induced pleurisy model. In the LPS-induced neuroinflammation model, oral treatment with LQFM212 (54 µmol/kg) reversed the anxiety-like and depression-like behaviors, in the open field, forced swimming and tail suspension tests, the increase of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and the decrease of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10), into animals' serum, caused

by intraperitoneal administration of LPS (1 mg/kg). In this same model, treatment with LQFM212 (54 μ mol/kg) also attenuated oxidative stress-related changes, demonstrated by reduced nitrite levels and myeloperoxidase (MPO) activity, and increased glutathione levels in the prefrontal cortex and hippocampus, and also reduced cholinesterase activity in the whole brain, of animals that received intraperitoneal administration of LPS (1 mg/kg). On the other hand, oral treatment with LQFM212 (54 μ mol/kg) failed to reduce the increase in cell migration and pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) in pleural exudate caused by intrapleural administration of 1% carrageenan or LPS (250 ng/mL) in the pleurisy model. In addition to the reduction in MPO activity seen in the LPS-induced neuroinflammation model, treatment with LQFM212 (54 μ mol/kg) also reduced the activity of this enzyme in the pleural exudate of animals subjected to the carrageenan- or LPS-induced pleurisy model. Taken together, the results showed that treatment with LQFM212 promotes behavioral changes suggestive of antidepressant-like activity in mice, which probably involve the monoaminergic pathways, in addition to increased hippocampal levels of BDNF, suggesting changes in synaptic neuroplasticity possibly as a mechanism underlying the antidepressant-like effect of the compound. The effects found in the LPS-induced neuroinflammation model did not seem to be secondary to a peripheral anti-inflammatory action of LQFM212, since this compound failed to reduce the changes caused by carrageenan or LPS in the pleurisy model. On the other hand, treatment with LQFM212 reduced MPO enzyme activity in pleural exudate, prefrontal cortex, and hippocampus, and increased *per se* GSH levels in both brain regions mentioned above, thus suggesting a possible antioxidant activity *in vivo* that may contribute to the effects observed in the neuroinflammation and pleurisy model.

Keywords: depression; piperazine; monoamines; neurotrophic factors; lipopolysaccharide; cytokines.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

A saúde mental faz parte do bem-estar de todos os indivíduos, contudo, é ainda negligenciada diversas vezes. Para alcançar um estado completamente saudável é necessário que o bem-estar físico, mental e social estejam em equilíbrio, e não apenas a ausência de enfermidades físicas. Os distúrbios mentais são frequentes em todo o mundo, e pessoas com tais condições podem sofrer por discriminação, falta de tratamento farmacológico e/ou psicológico, e de orientações adequadas. Os transtornos depressivos estão entre os distúrbios mentais que mais acometem os indivíduos em todo o mundo, o que leva a prejuízos sociais e financeiros. Por exemplo, pacientes com distúrbios mentais tem consideráveis dificuldades diárias, em casa, na escola ou no trabalho, sendo difícil tanto para a pessoa doente quanto para as pessoas à sua volta, uma vez que os pacientes necessitam de maior atenção e cuidados. Somado a esse quadro, os antidepressivos disponíveis para o tratamento dos transtornos depressivos normalmente necessitam de 2 a 4 semanas após o início da medicação para começarem a apresentar resposta clínica, dificultando a adesão dos pacientes ao tratamento farmacológico, além de que parte desses medicamentos têm falhado em alcançar a melhora completa dos sintomas em alguns pacientes. Estima-se que cerca de 30-50% dos pacientes depressivos não atingem a melhora significativa dos sintomas mesmo após um tratamento prolongado. Dessa forma, a busca por melhores fármacos para o tratamento dos distúrbios mentais se faz necessária. Os resultados da nossa pesquisa sugerem que o composto LQFM212, sintetizado no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, pode ser um promissor candidato a um protótipo de fármaco útil para o tratamento da depressão, baseado em sua capacidade de atuar nas diferentes vias biológicas envolvidas nesta patologia bem como associar um componente anti-inflamatório por mecanismos centrais além de sua possível atividade antioxidante.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais dos transtornos depressivos

Os transtornos depressivos são um problema de saúde comum em todo o mundo, com crescente número de casos ao longo dos anos e uma estimativa de que 3,8% da população mundial, aproximadamente 280 milhões de pessoas, é afetada por esta condição (**Figura 1**) (GBD, 2019). O Brasil é o país da América Latina com a maior prevalência, e estimativa de que 4,2% da população total, cerca de 9 milhões de pessoas, apresenta transtornos depressivos (GBD, 2019). A depressão pode ter início em pessoas jovens, dessa forma pode afetá-las no auge de seus anos mais produtivos. Como a depressão é comum, recorrente e altamente prejudicial, é essencial a busca por tratamentos e medidas de controle efetivas e acessíveis (WHO; CU, 2016).

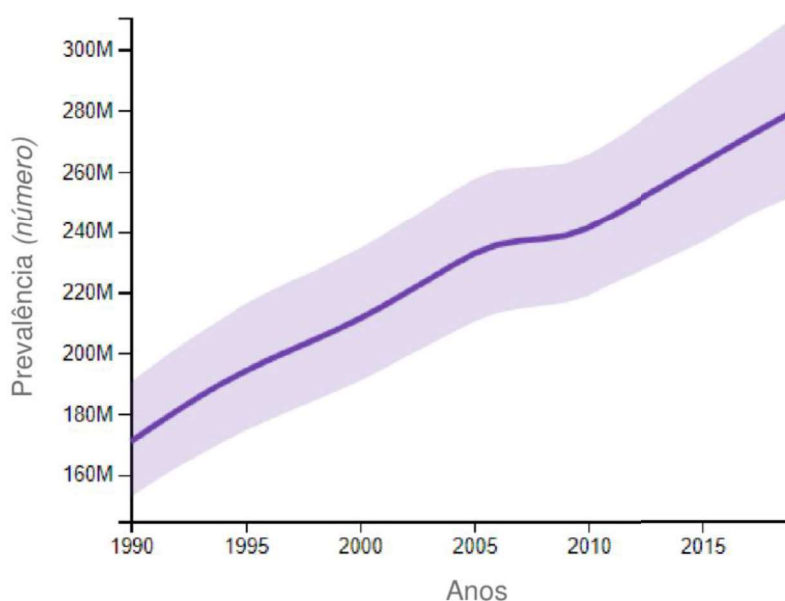


Figura 1. Prevalência global dos transtornos depressivos entre os anos de 1990-2019. A linha em roxo representa os dados em valor numérico, correspondente aos indivíduos com transtornos depressivos em todas as faixas etárias e sexo, e a área sombreada em roxo representa a variação desses dados. Adaptado de *Institute for Health Metrics and Evaluation - IHME (Global Burden of Disease Study - GBD, 2019 - <http://ghdx.healthdata.org>)*.

Embora existam tratamentos conhecidos e eficazes para os distúrbios mentais, mais de 75% das pessoas em países em desenvolvimento não recebem qualquer tratamento (psicológico e/ou farmacológico) (Evans-Lacko et al., 2018). Os obstáculos a cuidados eficazes incluem falta de recursos, falta de profissionais de saúde capacitados, erros de diagnóstico, falhas terapêuticas nas intervenções farmacológicas e estigma social associado aos distúrbios mentais. Em países de todos os níveis econômicos, frequentemente as pessoas que sofrem de transtornos depressivos não são diagnosticadas corretamente, e outras que não têm a doença recebem diagnóstico errôneo e são tratadas com antidepressivos sem necessidade (WHO, 2021).

Estes transtornos podem ser considerados como distúrbios heterogêneos, caracterizados como um transtorno de humor multifatorial que inclui aspectos emocionais, motivacionais e cognitivos. A taxa de incidência é alta, com maior prevalência entre as mulheres em relação aos homens. As perturbações mentais são características comuns dos transtornos depressivos, envolvendo principalmente humor triste persistente, portanto, se diferencia de flutuações de humor habituais e das respostas emocionais de curta duração aos desafios cotidianos (WHO, 2021). Quando a doença se apresenta com intensidade de moderada a severa, a depressão se torna um problema de saúde grave. É uma condição que afeta a mente e o corpo, ou seja, a forma como as pessoas cuidam de si mesmas, de suas famílias e como vivem em sociedade, ocasionando impacto tanto sobre a pessoa doente quanto sobre as pessoas à sua volta. No seu pior estágio, a depressão pode levar ao suicídio. Cerca de 700.000 pessoas morrem todos os anos devido ao suicídio, sendo a quarta principal causa de morte em indivíduos entre os 15-29 anos de idade, e entre estes inclui-se pacientes depressivos (WHO, 2021).

Os transtornos depressivos são subdivididos em duas categorias principais: transtorno depressivo maior (TDM) e transtorno depressivo persistente (TDP). Estes transtornos podem envolver sintomas como tristeza profunda, perda de interesse e prazer (anedonia), redução de energia, sentimento de culpa, baixa autoestima, alterações no apetite e sono. Um episódio depressivo pode ser classificado como leve, moderado ou grave, dependendo do número e da intensidade dos sintomas. O TDM é uma forma persistente de depressão leve, ou seja, os sintomas são menos intensos

e duram por mais tempo, e estes devem permanecer por pelo menos duas semanas (APA, 2022; WHO, 2017). TDM pode preceder TDP, e indivíduos com sintomas de TDM por mais de dois anos devem receber o diagnóstico de TDP (APA, 2022). A classificação completa dos transtornos depressivos, de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição - texto revisado (DSM-V-TR), está descrita no **Quadro 1**.

Quadro 1. Classificação dos transtornos depressivos

<i>Transtornos depressivos (DSM-V)</i>	
Tipo	Características principais
<i>Transtorno disruptivo da desregulação do humor</i>	Explosões de raiva recorrentes e graves, manifestadas pela linguagem e/ou comportamento - 3x na semana por 12 meses, em dois ambientes diferentes. Ocorre principalmente na infância.
<i>Transtorno depressivo maior</i>	Humor deprimido e/ou anedonia, associados a no mínimo outros quatro sintomas, por pelo menos duas semanas.
<i>Transtorno depressivo persistente</i>	Humor deprimido por pelo menos um ano em crianças e adolescentes, e de anos em adultos.
<i>Transtorno disfórico pré-menstrual</i>	Presença de no mínimo cinco sintomas depressivos durante a maioria dos ciclos menstruais.
<i>Transtorno depressivo induzido por substância/medicamento</i>	Perturbação proeminente do humor, com humor deprimido ou anedonia, evidenciados durante ou após administração, intoxicação ou abstinência de substâncias/medicamentos.

<i>Transtorno depressivo devido à condição médica</i>	Humor deprimido ou anedonia decorrentes de consequências de outra condição médica.
<i>Outro transtorno depressivo especificado</i>	Sintomas característicos de transtorno depressivo, mas que não satisfazem os critérios para uma das classificações.
<i>Transtorno depressivo não especificado</i>	Quadros clínicos que não possuem informações suficientes para fazer um diagnóstico mais específico.

Fonte: Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição - texto revisado (DSM-V-TR), Associação Americana de Psiquiatria (APA, 2022).

Segundo o DSM-V-TR, para o diagnóstico do TDM, que é o transtorno que se apresenta em maior frequência, pode se observar as manifestações clínicas dos sintomas. O indivíduo deve apresentar pelo menos um de dois sintomas principais, humor deprimido e/ou anedonia, em associação com pelo menos quatro outros sintomas secundários, como fadiga, alteração de apetite e sono, sentimento de culpa, desesperança, retardo ou agitação psicomotora, diminuição da libido, dificuldade de concentração, pensamentos recorrentes de morte ou tentativas de suicídio. Porém, como já mencionado, essas alterações devem perdurar por pelo menos duas semanas e interferir significativamente nas atividades profissionais e nas relações interpessoais do indivíduo (APA, 2022). Também é importante fazer distinção a respeito de indivíduos depressivos com ou sem histórico de episódios maníacos. No transtorno afetivo bipolar, o indivíduo geralmente apresenta episódios maníacos e depressivos separados por períodos de humor normal, em que os episódios maníacos envolvem humor elevado, excesso de atividade e diminuição da necessidade de dormir (Murri et al., 2016; WHO, 2017).

Quando os transtornos depressivos se apresentam em comorbidades com outras doenças, pode aumentar ainda mais a incapacitação funcional dos indivíduos. Uma variedade de estudos relaciona a depressão com doenças graves como epilepsia, diabetes, neoplasias, distúrbios cardiovasculares, doença de Alzheimer e transtornos de ansiedade (Hesdorffer et al., 2000; Santos et al., 2007; Carvalho et al., 2014; WHO, 2017). Comorbidades entre dois distúrbios mentais, como os transtornos

de ansiedade e os transtornos depressivos, pode ser de fato bastante prejudiciais, visto que estas doenças ocupam o primeiro e segundo lugar, respectivamente, entre os distúrbios mentais que mais acometem pessoas ao redor do mundo. Estima-se que 4% da população mundial, aproximadamente 301 milhões de pessoas, sofra com transtornos de ansiedade (WHO, 2021).

1.2 Neurobiologia dos transtornos depressivos

O início e manutenção dos transtornos depressivos advém de interações entre fatores genéticos e ambientais e características individuais. A vulnerabilidade genética tem sido frequentemente associada a elevado risco de surgimento de transtornos de humor, e estudos tem mostrado que a herdabilidade do TDM varia entre 28-44% (Fernandez-Pujals et al., 2015; Song et al., 2015). A exposição a fatores ambientais como situações estressantes no início e durante a vida em associação com as características dos indivíduos, por exemplo, hereditariedade genética, fatores sociais, culturais e comportamentais, contribui para desencadear episódios depressivos, tanto em indivíduos predispostos quanto na população geral, tornando-os mais vulneráveis a reapresentar novos episódios, além de contribuir para a gravidade da doença (Joca et al., 2003; Margis et al., 2003; Patten, 2003; Bastos, 2011; Cronkite et al., 2013).

O termo estresse inicialmente usado na física para traduzir o grau de deformidade sofrido por um material a um esforço ou tensão, foi utilizado pela primeira vez na medicina e biologia por Hans Selye, em 1926. Este termo pode ser denominado como o conjunto de reações que um organismo desenvolve ao ser submetido a uma situação que exige esforço para a adaptação. Neste sentido, o organismo quando exposto a situações consideradas como ameaçadoras ao equilíbrio interno (homeostase), induz alterações que levam a adaptação do organismo na tentativa de neutralização da ameaça, porém, quando o corpo não consegue manter a homeostase, inicia-se um processo de adoecimento, manifestado pelo surgimento de doenças psicossomáticas, como os transtornos depressivos (Silva, 2010; Espíndola, 2012; Silva et al., 2018).

A neurobiologia dos transtornos depressivos é considerada como um processo complexo que envolve alterações em diferentes redes neuronais, como a hipofunção de neurotransmissores monoaminérgicos, baixos níveis de fatores neurotróficos,

como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), aumento de processos neuroinflamatórios, desbalanço oxidativo e alteração de eixos neuroendócrinos, especialmente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Bastos, 2011; Quevedo; Silva, 2013; Smaga et al. 2015; Fiksdal et al., 2019). Em resposta ao estresse agudo, o eixo HPA é ativado e, por conseguinte, promove a liberação de glicocorticoides pela glândula adrenal, ativando mecanismos de *feedback* negativo para manter a homeostase desse sistema (Juruena et al., 2004; Goldstein et al., 2014; Han; Nestler, 2017). No entanto, a persistência e/ou intensidade exagerada do estresse resulta em hiperatividade do eixo HPA, com consequente hipercortisolemia, que contribui para o início dos sintomas depressivos (Sheline et al., 2003; Claes, 2009; Quevedo; Silva, 2013; Zhu et al., 2014; Han; Nestler, 2017).

Alterações na morfologia de várias regiões cerebrais e circuitos que regulam a emoção, recompensa e função executiva, tem sido demonstrada nos transtornos depressivos (Van Velzen et al., 2017; Hollos et al., 2018). Estudos de neuroimagem em pacientes deprimidos demonstram que ocorrem reduções volumétricas em áreas que mediam aspectos cognitivos, como a matéria cinzenta periaquedutal (MCPD), córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo. Por outro lado, estudos que avaliam a função cerebral mostram que a atividade neuronal da amígdala e córtex cingulado se encontra aumentada, e podem estar correlacionados com a disforia. O estresse possui um importante papel para essas alterações e o tratamento com antidepressivos auxiliam para o retorno da morfologia dessas regiões (Drevets, 2000; Ressler; Mayberg, 2007; Krishnan; Nestler, 2008).

O estresse é capaz de ativar o sistema imune periférico e central por ação do sistema nervoso simpático. Durante a resposta aguda ao estresse, além de cortisol também são liberadas catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina. Com a ativação inicial do eixo HPA, o cortisol atua em receptores para glicocorticoides periféricos, presentes em monócitos e macrófagos, exercendo um efeito anti-inflamatório (Miller et al., 2009). No entanto, em situações de estresse prolongado e hiperatividade do eixo HPA, o sistema imune se torna resistente a ação dos glicocorticoides, e ainda pode promover efeitos contrários, ou seja, acarretando na ativação de respostas inflamatórias, por exemplo, pela via do fator nuclear kappa B (NF- κ B). A ativação crônica desse eixo além de promover efeitos prejudiciais na função imune, também pode levar a alterações em neurotransmissões, como as vias monoaminérgicas, e na secreção de fatores neurotróficos (Pace et al., 2007; Bao;

Swaab, 2019).

As monoaminas, serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NE), estão envolvidas em diversas funções no sistema nervoso central (SNC). Levando em conta a origem e projeções dos neurônios do sistema monoaminérgico, é perceptível que estas vias estejam envolvidas em muitos sintomas comportamentais dos transtornos depressivos, tais como regulação do humor, apetite e sono, sistema de recompensa, funções cognitivas, tomada de decisões, vigilância, fadiga e agitação ou retardo psicomotor (Reid; Stewart, 2001; Bondy, 2002). Estes sintomas podem surgir decorrente de uma função anormal da neurotransmissão monoaminérgica no cérebro (Bondy, 2002). O tratamento farmacológico dos transtornos depressivos modulam principalmente as vias monoaminérgicas, levando a restauração das mesmas, uma vez que é mostrado que ocorre uma hipofunção das monoaminas nestes transtornos. Entretanto, as alterações nas vias monoaminérgicas não explicam totalmente a neurobiologia dos transtornos depressivos, e outros mecanismos e neurotransmissores tem se mostrado importantes para o desenvolvimento e manutenção da depressão (Bondy, 2002; Nishida et al., 2002; Vismari et al. 2008; Dale et al., 2015; Fasipe, 2018).

O glutamato é um neurotransmissor excitatório e está envolvido no desenvolvimento de neurônios e axônios, na sobrevivência neuronal, além de regular a atividade de neurônios monoaminérgicos e auxiliar na conexão entre estruturas límbicas e áreas corticais. Em condições de estresse metabólico e/ou oxidativo, ocorre aumento na liberação de glutamato com ativação excessiva dos seus receptores. O alto potencial do glutamato em induzir excitotoxicidade leva a alterações nas redes neurais, com danos nas sinapses, atrofia, morte neuronal, e consequentemente, também pode ser relacionado à neurobiologia dos transtornos depressivos (Hashimoto, 2009; Maletic; Raison, 2009). Em concordância, resultados apontam que a concentração de glutamato no líquido cefalorraquidiano e no plasma de pacientes com depressão é superior ao de indivíduos saudáveis (Maes et al., 1998). Além disso, os antagonistas de receptores NMDA, cetamina e amantadina, apresentam ação antidepressiva. Os efeitos da cetamina parecem estar relacionados com um aumento nos níveis de BDNF (Stryker et al., 2003; Garcia et al., 2008).

O excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) e deficiências no sistema antioxidante geram um estado de estresse oxidativo e este desempenha um papel nos transtornos depressivos. A relação entre estresse

oxidativo e os transtornos mentais dá-se pelo fato de o sistema nervoso ser particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido ao alto consumo de oxigênio, a grande quantidade de lipídeos como substrato para a oxidação e altas concentrações de íons de ferro e cobre, que estão envolvidos nas reações redox (Siwek et al., 2013). O cérebro produz ERONs constantemente e na ausência de mecanismos de defesa antioxidantes eficientes podem causar danos neuronais (Campêlo et al., 2011). Os danos neuronais gerados pelo estresse oxidativo estão relacionados com disfunções mitocondriais, inibição da neurogênese e indução de vias apoptóticas (Cregan et al., 2002). Diversas substâncias úteis com marcadores de estresse oxidativo, como o malondialdeído (MDA) e carbonil tem se mostrado elevadas em pacientes com transtornos depressivos (Lopresti et al., 2014). Por outro lado, compostos com potencial antioxidantes protegem as células contra os danos causados pelos ERONs, podendo esta atividade ser relacionada com efeitos antidepressivos (Zafir et al., 2009).

1.2.1 Hipótese monoaminérgica

A neurobiologia dos transtornos depressivos ainda não está completamente clara, mas a hipótese monoaminérgica é válida e ajuda a explicar parte do que ocorre nesta doença. As primeiras evidências de que alterações no sistema monoaminérgico podem levar ao surgimento de transtornos depressivos, surgiram a partir da observação de que alguns fármacos exerciam efeitos inesperados sobre o humor de pacientes (Nestler et al., 2002; Kalia, 2005). Na década de 1940, a imipramina foi sintetizada para ser um fármaco antipsicótico, porém foi demonstrado que o tratamento com este fármaco exercia efeitos antidepressivos por otimizar as neurotransmissões serotoninérgicas e noradrenérgicas. Em 1951, foi visto que a iproniazida, um fármaco utilizado no tratamento da tuberculose, apresentava como efeito secundário uma melhora no humor dos pacientes (Crane, 1956; Kuhn, 1958). Ainda na década de 1950, a descoberta de que o uso da reserpina como anti-hipertensivo causava humor deprimido como um dos efeitos adversos, por depletar os estoques de monoaminas, também foi importante para verificar o envolvimento do sistema monoaminérgico nos transtornos depressivos (Owens; Nemeroff, 1994; Krishnan; Nestler, 2008).

Segundo esta hipótese, a depressão resulta de déficits na neurotransmissão

monoaminérgica por redução das monoaminas NE, 5-HT e DA na fenda sináptica, e os antidepressivos restauram os níveis de monoaminas em um período relativamente rápido (**Figura 2**), mas demoram de 2 a 4 semanas para exercer o efeito terapêutico. Assim, pode se acrescentar a esta teoria que, além da redução nos níveis das monoaminas, também podem ocorrer alterações relacionadas aos receptores monoaminérgicos (Lafer; Vallada-Filho, 1999; Nestler et al., 2002; Kalia, 2005). Dessa forma, poderiam ocorrer alterações envolvendo síntese, armazenamento ou liberação dos neurotransmissores, bem como a sensibilidade perturbada de seus receptores e funções intracelulares dos segundos mensageiros (Bondy, 2002).

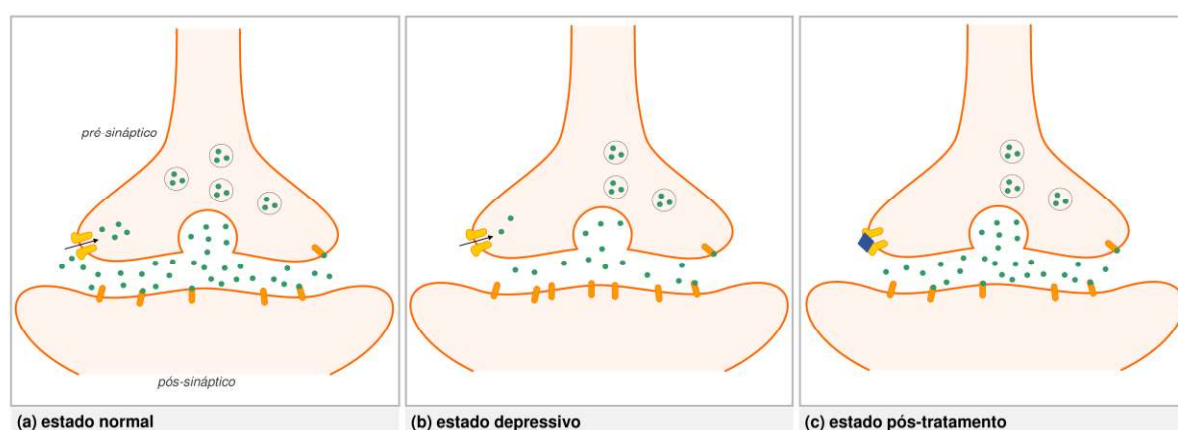


Figura 2. Hipótese monoaminérgica dos transtornos depressivos. (A) No cérebro normal, os neurotransmissores conhecidos como monoaminas (verde), serotonina, noradrenalina e dopamina, são liberados das vesículas sinápticas por exocitose após a chegada de um potencial de ação no terminal pré-sináptico e podem ligar-se aos seus respectivos receptores no terminal pré- e/ou pós-sináptico (laranja). A neurotransmissão pode ser encerrada por ação dos transportadores de recaptção (amarelo). (B) Nos transtornos depressivos, a redução dos níveis de monoaminas em locais sinápticos, bem como alterações no número e/ou sensibilidade de seus receptores contribuem para o aparecimento dos sintomas depressivos. (C) Na presença de um inibidor de recaptção (azul), pelo bloqueio do transportador ocorre um aumento da concentração das monoaminas neurotransmissores disponíveis na fenda sináptica e pode auxiliar na restauração do humor. Adaptado de Castrén, 2005.

1.2.2 Hipótese neurotrófica

Devido à complexidade dos transtornos depressivos, existem outras teorias que ajudam a explicar a sua neurobiologia, como a hipótese neurotrófica, a qual sugere que baixos níveis de BDNF podem estar associados com estes transtornos (**Figura 3**). O BDNF é uma proteína que pertence à família das neurotrofinas e participa da integridade neuronal ao longo da vida, além disso durante a vida embrionária influencia no desenvolvimento do SNC, além de estar envolvido no crescimento, diferenciação, plasticidade e sobrevivência celular no adulto. A produção de BDNF ocorre no SNC e periférico, sendo mediada em condições fisiológicas por neurônios, e após lesão, inflamação ou administração de antidepressivos por astrócitos. O BDNF medeia suas funções através da ligação a receptores de tropomiosina quinase B (TrkB). No SNC está presente em maior abundância no hipocampo (Tapia-Arancibia et al., 2004; Maletic, 2007; Piccinni et al., 2008; Shalev et al., 2009; Phillips, 2017).

Segundo esta hipótese, o estresse e a predisposição genética são responsáveis pela elevação dos glicocorticoides e pela alteração da plasticidade neuronal. A redução de BDNF também pode estar relacionada com a atrofia celular no hipocampo e em outras estruturas do sistema límbico, uma vez que remissão desta atrofia é dependente do restabelecimento dos níveis de BDNF (Duman; Monteggia, 2006; Maletic, 2007; Castrén; Rantamaki, 2010). Alguns estudos demonstram que ocorre redução plasmática de BDNF em indivíduos deprimidos e com administração de antidepressivos esses valores são restaurados (Shimizu et al., 2003; Piccinni et al., 2008; Taliaz et al., 2010).

Além da redução dos níveis de BDNF, que pode ocorrer após períodos de estresse agudo ou crônico, o mau funcionamento de seu receptor TrkB também contribui para os transtornos depressivos (Castrén; Rantamaki, 2010). Neste sentido, a regulação positiva do BDNF induzida pelo antidepressivo pode ajudar a reparar danos causados pelo estresse aos neurônios do hipocampo e proteger os neurônios de outros danos, auxiliando na função hipocampal. Essa hipótese também ajuda na compreensão da demora no início do efeito terapêutico dos antidepressivos, uma vez que pode levar algum tempo para que gradualmente os níveis de BDNF aumentem e exerçam seus efeitos neurotróficos (Nestler et al., 2002).

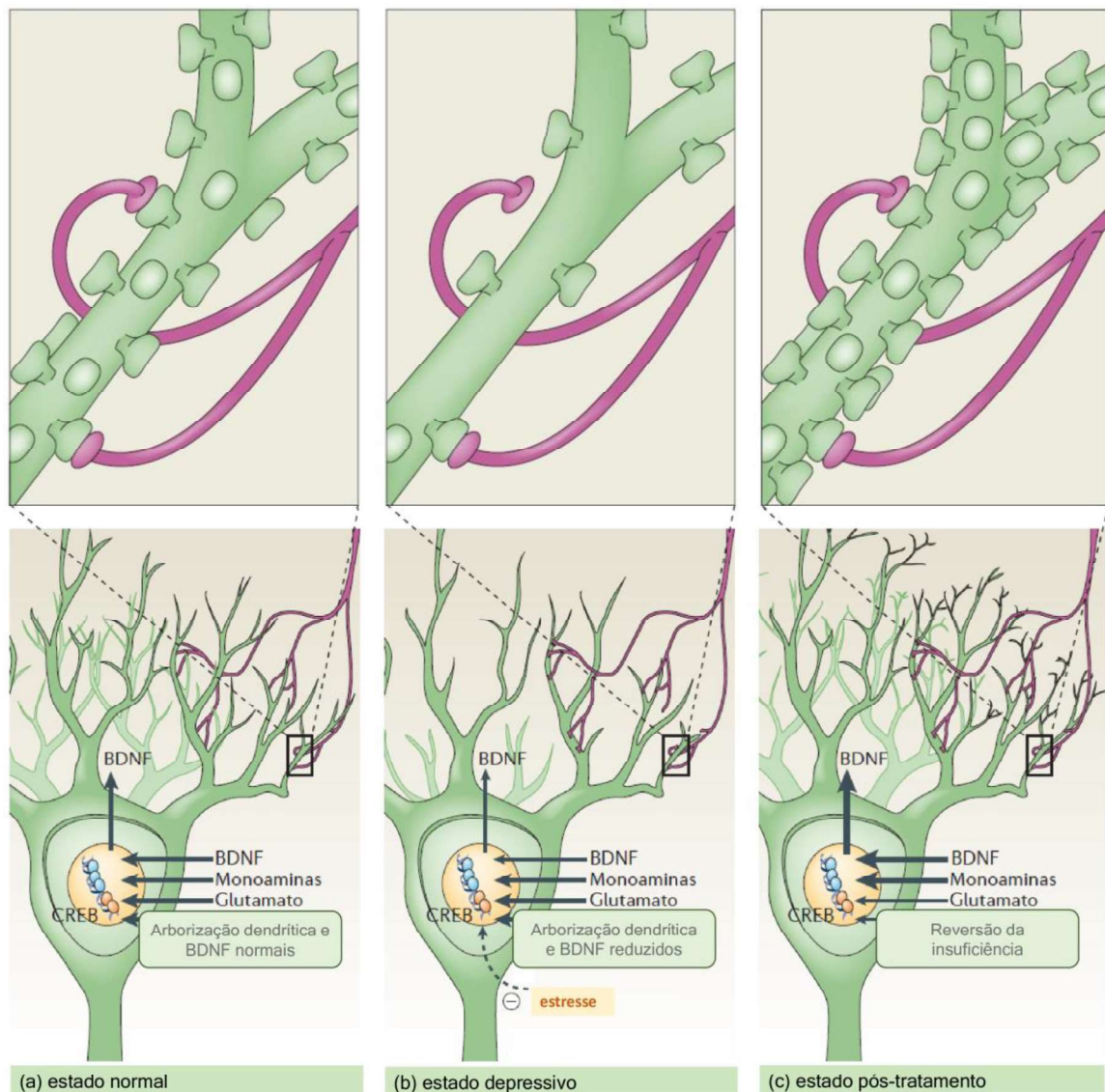


Figura 3. Hipótese neurotrófica dos transtornos depressivos. (A) No primeiro painel é representado um neurônio piramidal, sua inervação por neurônios glutamatérgicos e monoaminérgicos, bem como arborização dendrítica e expressão de BDNF normais. (B) Condições de estresse intenso causam várias alterações nos neurônios, incluindo uma redução em suas arborizações dendríticas, e uma redução na expressão de BDNF. A redução de BDNF é mediada em parte pelo excesso de glicocorticoides, que podem interferir com mecanismos transcripcionais normais, por exemplo, através da proteína CREB, que controlam a expressão de BDNF. (C) Os antidepressivos produzem efeitos opostos, visto que aumentam a arborização dendrítica e a expressão de BDNF, que parece ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação de CREB. Por estas ações, os antidepressivos podem reverter e

prevenir os efeitos do estresse e amenizar alguns sintomas dos transtornos depressivos. BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; CREB, proteína de ligação responsiva ao AMPc. Adaptado de Nestler et al., 2002; Berton; Nester, 2006.

1.2.3 Hipótese neuroinflamatória

A inflamação é uma condição que ocorre pela ativação de mecanismos moleculares e celulares em resposta a algum tipo de injúria ou infecção, com o intuito de reduzir danos e auxiliar no reparo da área atingida. No SNC, quando a inflamação ocorre de maneira desregulada, pela persistência do estímulo inflamatório ou falhas nos mecanismos de resolução, resulta na produção de fatores neurotóxicos (da Ré, 2015). O SNC já foi considerado como um local imunologicamente privilegiado devido à presença da barreira hematoencefálica (BHE) e ausência de vasos linfáticos, o que protegeria de uma infiltração de células imunológicas e, consequentemente de uma resposta inflamatória. Entretanto, ao longo dos anos, tem sido demonstrado que a resposta imune cerebral em resposta a estímulos nocivos ocorre, tanto por ativação das células gliais residentes neste órgão, como pela presença de células periféricas, as quais tem acesso ao SNC após algum dano na BHE (Ransohoff; Brown, 2012; Siqueira, 2016). Ademais, estudos recentes mostraram que o SNC possui sistema linfático, sendo este encontrado nos seios durais próximo a grandes vasos sanguíneos e podem participar do transporte de células imunológicas (Louveau et al., 2015).

Outra via importante para a propagação da resposta inflamatória sistêmica para o SNC envolve a ativação do nervo vago aferente, que funciona como um sensor visceral da inflamação durante infecções abdominais e viscerais. O nervo vago possui receptores para citocinas e receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR) em seu axônio que se projeta para o cérebro (Mravec, 2010; Janig; Green, 2014). Além disso, nas regiões dos órgãos circunventriculares e do plexo coroide, que são desprovidos de BHE, constitutivamente são expressas proteínas para o reconhecimento de patógenos, como os *Toll-like receptors* (TLR), além de receptores para citocinas pró-inflamatórias. A ativação de receptores TLR presentes nos órgãos circunventriculares induz a produção e liberação de citocinas no SNC, e por conseguinte, ativação da micróglia (Tracey, 2002; Czura; Tracey, 2005).

A principal função da micróglia está relacionada com respostas imunes, sendo considerada como a primeira linha de defesa celular a responder durante danos ao SNC, atuando de maneira semelhante a macrófagos em outros órgãos (Aloisi, 2001; Saijo; Glass, 2011). A micróglia pode exibir fenótipos distintos, por exemplo, em condições normais apresenta um fenótipo quiescente ou em repouso, caracterizado por micróglia na forma ramificada, e durante infecções e/ou lesões no SNC apresenta um fenótipo ativado, em que a micróglia adquire uma forma ameboide (**Figura 4**). Quando exibe o fenótipo quiescente, ou seja, não ativada, pode ter um papel na neurogênese e neuroproteção (Sierra et al., 2010; Vinet et al., 2012).

Após ativada, a micróglia fagocita patógenos e restos celulares, além de liberar quimiocinas, ERONs e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), que contribuem para a eliminação dos patógenos. No entanto, a ativação prolongada ou excessiva das células microglias podem resultar em uma inflamação prejudicial que contribuem para a progressão de doenças relacionadas ao SNC, como doenças neurodegenerativas e transtornos mentais (Vismari et al., 2008; Saijo; Glass, 2011; Almeida et al., 2020a). Como mencionado anteriormente, o estresse é um importante fator para a ativação imune; e é importante ressaltar que além da ativação microglial, a desregulação das respostas inflamatórias também podem contribuir para os transtornos mentais através de uma variedade de mecanismos, incluindo ativação da via das quinureninas, eixos neuroendócrinos, alterações nas vias monoaminérgicas e plasticidade neuronal (Almeida et al., 2020a) (**Figura 4**).

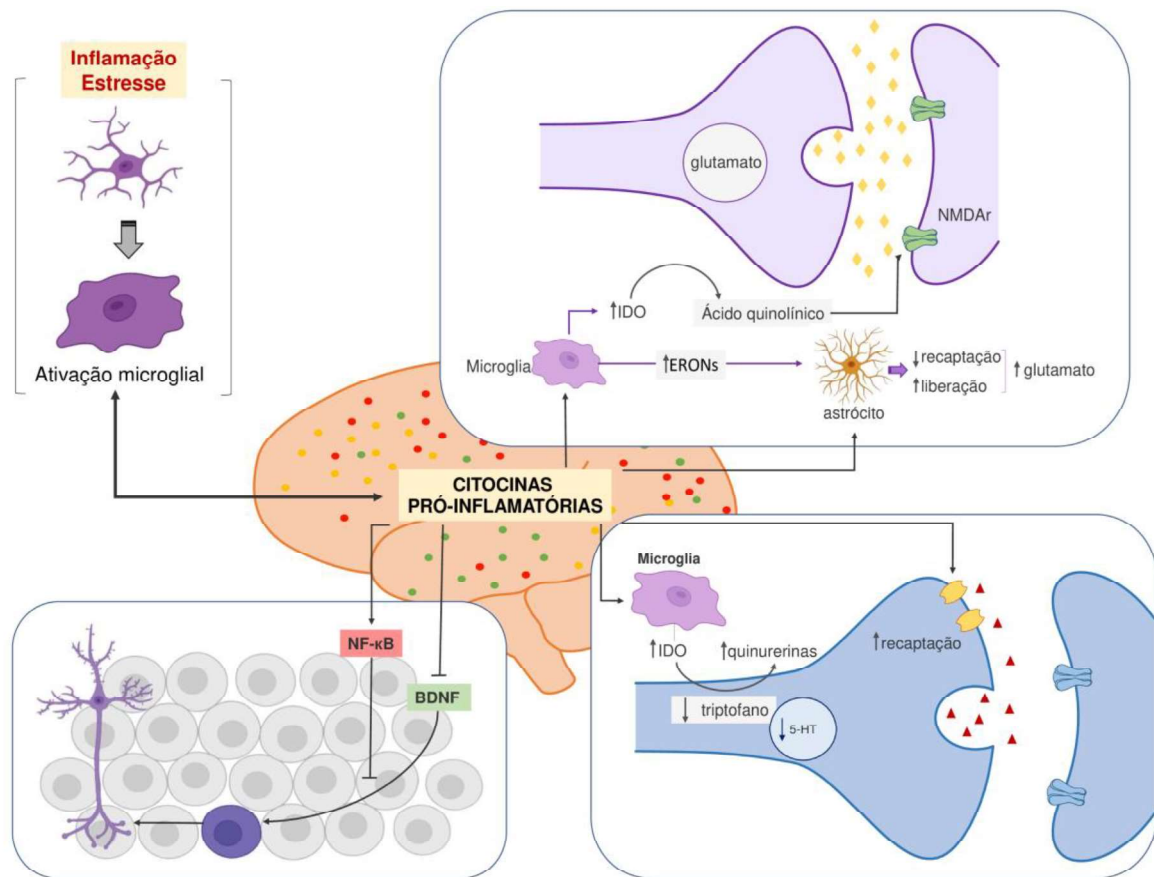


Figura 4. Efeitos centrais causados por citocinas pró-inflamatórias. As respostas neuroinflamatórias podem afetar neurotransmissões e circuitos neurológicos que regulam comportamentos relacionados aos distúrbios mentais, incluindo os transtornos depressivos. Condições de estresse e/ou inflamação podem ativar o eixo HPA, e as catecolaminas secretadas ativam células imunes, favorecendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-1 β e TNF- α . Mediante sinais periféricos e/ou centrais, a microglia em repouso se torna ativa, assumindo uma forma ameboide, liberando citocinas e quimiocinas. As citocinas pró-inflamatórias podem diminuir a disponibilidade das monoaminas, 5-HT, DA e NE, por redução de cofatores enzimáticos, sensíveis ao estresse oxidativo, para a síntese destes neurotransmissores, como a tetra-hidrobiopterina (BH4); bem como pelo aumento da expressão de transportadores de recaptação, pela ativação de MAPK. A ativação de macrófagos e/ou microglia resulta em maior atividade da enzima IDO, deslocando o triptofano - precursor de serotonina - para a via das quinureninas, e aumentando a produção de metabólitos, como o ácido quinolínico, que podem ativar os receptores

glutamatérgicos NMDA. EROns também gerados pela ativação microglial alteram a função astrocitária que contribui para o aumento de glutamato, e por conseguinte, excitotoxicidade e redução de fatores neurotróficos, como o BDNF. Em regiões de elevada neurogênese, como no hipocampo, as citocinas pró-inflamatórias bem como a ativação de vias inflamatórias, como a via do NF- κ B, prejudicam as funções do BDNF na plasticidade sináptica. 5-HT, serotonina; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; EROns, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; IDO, indoleamina-2,3-dioxigenase; MAPK, proteíno-quinases ativadas por mitógenos; NF- κ B, fator nuclear kappa B; NMDAr, receptor glutamatérgico NMDA - N-metil-D-Aspartato. Adaptado de Miller; Raison, 2016; Géa, 2019.

Evidências tem mostrado que ocorre um aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes depressivos (Howren et al., 2009; Dowlati et al., 2010; Hannestad et al., 2011); além disso, nessas condições os pacientes não apresentam boa resposta terapêutica com antidepressivos convencionais (Drevets et al., 2022). A intensa ativação de vias imunológicas e inflamatórias em pacientes depressivos leva a um desequilíbrio entre EROns e defesas antioxidantes (Kubera et al., 2011; Leonard; Maes, 2012). A permanência do estresse oxidativo está relacionada a episódios depressivos prolongados com menor intervalo de tempo entre eles, além de declínio cognitivo e modificações neuroanatômicas (Duman et al., 2000). Além de observações clínicas, estudos em modelos animais mostram que existe uma conexão entre a produção de citocinas no SNC, comportamento doentio (do inglês *sickness behavior*) e os transtornos depressivos (Dantzer et al., 2008; Konsman et al., 2002).

A neuroinflamação pode ser induzida experimentalmente pela administração de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas que contribui para a proteção e integridade estrutural da bactéria (Tuin et al., 2006). O LPS é considerado uma endotoxina, atua em receptores TLR4 sinalizando, dessa forma, para ativação de mecanismos celulares inflamatórios (Akira; Takeda, 2004; Batista et al., 2019). Em resposta a agentes infecciosos pode ser desencadeado um estado conhecido como comportamento doentio que normalmente é reversível devido a capacidade do sistema imunológico de eliminar os agentes patógenos e aos mecanismos de resolução que se opõem a produção e ação das citocinas pró-inflamatórias, tanto na periferia como no cérebro (Dantzer et al., 2018).

No cérebro, o LPS desencadeia um conjunto de modificações microgliais e a produção de mediadores pró-inflamatórios (Meng; Lowell, 1997; Wen et al., 2007; Chung et al., 2010; Leow-Dyke et al., 2012). A neuroinflamação quando leva ao comportamento doentio, causa sintomas de humor deprimido, letargia e retardo motor, anedonia, desregulação de sono e apetite (Kessler et al., 2005; Farooq et al., 2012). O comportamento doentio pode ser distinguível do comportamento depressivo (**Figura 5**), experimentalmente, pelo registro da atividade locomotora espontânea dos animais (Frenois et al., 2007). Dessa forma, é possível utilizar o modelo de neuroinflamação induzida por LPS para avaliação de comportamentos mais específicos, como os comportamentos depressivos.

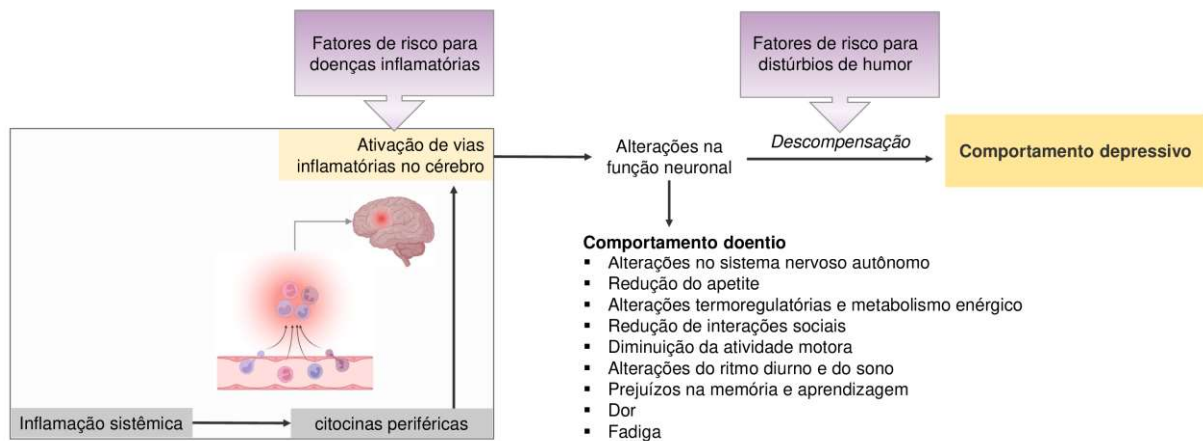


Figura 5. Comportamento depressivo causado por descompensação de mecanismos que regulam o comportamento doentio. Agentes infecciosos podem desencadear um estado conhecido como comportamento doentio pela produção e ação das citocinas pró-inflamatórias, tanto na periferia como no cérebro, entretanto este estado normalmente é reversível. A descompensação dos mecanismos que regulam o comportamento doentio pode ocorrer em indivíduos vulneráveis cuja resposta inflamatória é mais intensa devido a um desequilíbrio entre mediadores pró- e anti-inflamatórios, por exemplo, excesso de TNF- α , produção insuficiente de interleucina (IL)-10 e resistência aos glicocorticoides. Também pode ocorrer devido a maior sensibilidade cerebral a eventos imunes devido ao metabolismo alterado de neurotransmissores, por exemplo, mau funcionamento da via serotoninérgica decorrentes de alterações genéticas [(ex. genes que codificam o transportador de serotonina (SERT)]. Adaptado de Dantzer et al., (2018).

1.3 Tratamento farmacológico dos transtornos depressivos

Para a intervenção farmacológica dos transtornos depressivos, são utilizados fármacos antidepressivos que visam, principalmente, o aumento da disponibilidade sináptica das monoaminas, 5-HT, NE e, em menor extensão, de DA. Existem fármacos que inibem a recaptação dos neurotransmissores por bloquear o transportador de monoaminas; outros podem inibir a degradação intracelular pela inibição da enzima monoamino oxidase (MAO); ou ainda podem interagir com receptores pré- e/ou pós-sinápticos que regulam a liberação das monoaminas e/ou a taxa de disparo neuronal (Nemeroff; Owens, 2002).

O fármaco iproniazida, foi importante para o entendimento da neurobiologia dos transtornos depressivos e para a elaboração da hipótese monoaminérgica. Além disso, tornou-se o primeiro fármaco classificado como inibidor da monoamino oxidase (IMAO). A enzima MAO está localizada no terminal pré-sináptico, e é responsável pela degradação das aminas biogênicas. Como resultado da inibição desta enzima, as concentrações de monoaminas aumentam no terminal pré-sináptico e ficam disponíveis para serem liberadas quando o potencial de ação chega ao terminal nervoso. Os IMAOs diferem entre si pela sua reversibilidade e seletividade conforme as isoformas da MAO (MAO-A e MAO-B). Os seus principais efeitos adversos dos IMAOs são hipotensão ortostática, efeitos anticolinérgicos, ganho de peso, fadiga, agitação, espasmos musculares e convulsões, e sua prescrição é restrita para quando outras classes não melhoram o estado do paciente (Ciraulo et al., 2011; Hillhouse; Porter, 2015).

O efeito adverso mais tóxico do uso dos IMAO é a toxicidade sistêmica da tiramina, conhecida como “reação do queijo”. Como a MAO também metaboliza a tiramina, o consumo de alimentos que contêm tiramina, como queijos e vinho tinto, levam a níveis excessivos de tiramina, uma vez que a enzima está inibida pela presença do fármaco. Como resultado pode ocorrer uma crise hipertensiva, caracterizada por cefaleia, taquicardia, náuseas, arritmias cardíacas e acidente vascular cerebral. Como alternativa tem-se uma geração de IMAO mais recentes, isto é, os inibidores reversíveis da MAO-A (IRMA), que se ligam de modo reversível à MAO. Estes são deslocados por concentrações elevadas de tiramina e, conseqüentemente, a toxicidade da tiramina é reduzida (Nadal-Vicens et al., 2014).

A imipramina, outro fármaco importante na elaboração da hipótese monoaminérgica, foi aprovada em 1959 pelo *Food and Drug Administration (FDA)* para o tratamento dos transtornos depressivos e deu início a classe de fármacos denominados como antidepressivos tricíclicos (ADT), cujo mecanismo de ação ocorre pela inibição da recaptação de NE e 5-HT. Os ADT também são antagonistas de receptores adrenérgicos, muscarínicos e histaminérgicos, o que contribui para os efeitos adversos como tonturas, déficits de memória, sedação, boca seca e sonolência (Owens et al., 1997; Hillhouse; Porter, 2015).

Outros fármacos importantes para o tratamento da depressão são os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN), que, atualmente, constituem a primeira linha de escolha no tratamento desta patologia. Os ISRS levam ao aumento na biodisponibilidade de 5-HT, por inibir a recaptação deste neurotransmissor. Os efeitos adversos associados ao uso dos ISRS são náuseas, insônia e disfunção sexual (Papakostas, 2009; Locke et al., 2015). Já os IRSN levam à inibição da recaptação tanto de 5-HT quanto de NE, porém com maior afinidade ao transportador de NE (Papakostas, 2009). Estas duas classes apresentam efeitos adversos menores se comparados com os IMAO e ADT, porém sem apresentar início de ação mais rápido (Goldman et al., 1999; Neves et al., 2015).

Os fármacos que atuam na neurotransmissão dopaminérgica também podem ser utilizados, como a bupropiona, que seus efeitos ocorrem por inibir a recaptação de DA e NE, exibindo maior afinidade de ligação para transportadores de dopamina (DAT). Os efeitos adversos são bem tolerados e os mais frequentes são boca seca, náuseas e insônia. Um ponto positivo para esse fármaco, é que apresenta menor risco de disfunção sexual, se comparado com os antidepressivos clássicos (Ciraulo et al., 2011; Hillhouse; Porter, 2015).

Com o avanço dos estudos, possibilitou o desenvolvimento de fármacos que bloqueiam a recaptação de serotonina, ao mesmo tempo que produzem efeitos adicionais por atuarem em outros subtipos de receptores serotoninérgicos. Por exemplo, a vilazodona que é um ISRS e agonista parcial de receptor de 5-HT_{1A}, e a vortioxetina que, além do bloqueio do SERT, se liga a vários subtipos de receptores 5-HT (5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT₃ e 5-HT₇) (Harmer et al. 2017). Embora seja sugerido que a vilazodona produza menos disfunção sexual e a que vortioxetina parece ter benefícios particulares na depressão relacionada com a deficiência cognitiva, não é

totalmente claro se estes agentes têm vantagens sobre o tratamento com ISRS (Deardorff; Grossberg, 2014). Alguns antidepressivos parecem não atuarem diretamente através do bloqueio dos transportadores para serotonina e noradrenalina, como a mirtazapina, que produz efeito antidepressivo por bloquear autoreceptores α_2 -adrenérgicos em neurônios noradrenérgicos e heteroreceptores em neurônios serotoninérgicos, facilitando assim a liberação de NE e 5-HT, respectivamente. Ademais, a capacidade de antagonizar receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} também poderia aumentar a liberação de norepinefrina e dopamina nas regiões corticais (Cleare et al. 2015; Harmer et al., 2017).

De maneira geral, os antidepressivos discutidos acima melhoram os quadros depressivos por aumentarem a disponibilidade das monoaminas, pelo menos inicialmente. Entretanto, os fármacos antidepressivos que possuem seu mecanismo de ação com base nas vias monoaminérgicas apresentam efeitos adversos notáveis, bem como pode ocorrer atraso para o início da eficácia terapêutica e cerca de um terço dos pacientes não respondem ao tratamento com estes fármacos. Notavelmente, a descoberta de que a cetamina, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, promove efeitos antidepressivos levou à aprovação da escetamina para administração como spray nasal e por via endovenosa.

Diferentemente dos antidepressivos clássicos, a escetamina proporciona alívio rápido dos sintomas depressivos, contudo, os riscos significativos associados a escetamina limitam a sua ampla utilização, sendo mais indicada para pacientes depressivos resistentes ao tratamento farmacológico. Os efeitos adversos mais comuns causados pela escetamina incluem dissociação, tontura, náusea, sonolência, ansiedade e aumento da pressão arterial, delírio e tendência suicida (Kowalski et al., 2021; Elias et al., 2022). Ademais, estudos direcionados para investigar novos alvos farmacológicos para o tratamento dos transtornos depressivos apontam que compostos visando processos biológicos, como mecanismos inflamatórios, ativação do eixo HPA, alterações na microbiota intestinal entre outros tem mostrado potencial terapêutico (Elias et al., 2022).

1.4 Derivados piperazínicos

Considerando a investigação de novos candidatos a fármacos psicoativos, com melhor eficácia e menores efeitos adversos, os derivados piperazínicos constituem

uma atraente classe de compostos químicos. Alguns desses derivados possuem a capacidade de atravessar a BHE e atuar no SNC, produzindo inúmeras atividades neurofarmacológicas, como efeito ansiolítico (Brito et al., 2012), antidepressivo (Galdino et al., 2015a) e antipsicótico (Neves et al., 2013; Siskind, 2016). Parte dessas atividades estão correlacionadas a características lipofílicas e pequeno tamanho molecular que alguns derivados piperazínicos apresentam. Alguns fármacos disponíveis para o tratamento farmacológico dos transtornos depressivos, possuem um anel piperazínico em sua estrutura química, por exemplo, buspirona, trazodona, nefazodona, vortioxetina e vilazodona. Esses fármacos são relativamente recentes e produzem suas ações por mecanismos de ações variados.

O composto 2,6-di-*tert*-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1-*il*)metil)fenol (LQFM212) (**Figura 6**) é um derivado piperazínico, desenhado e sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM - Faculdade de Farmácia, UFG) coordenado pelo professor Dr. Ricardo Menegatti. Foi sintetizado pela estratégia química de hibridação molecular, tendo como precursores os compostos LQFM032 e hidroxitolueno butilado (BHT). O primeiro composto possui atividade tipo-ansiolítica mediada pelas vias nicotínica e GABAérgica (Brito et al., 2017) e o segundo é um potente antioxidante frequentemente utilizado na indústria alimentícia (Grillo et al., 1999). A síntese e caracterização do composto LQFM212 foram anteriormente publicadas, bem como os resultados mostrando seu potencial efeito tipo-ansiolítico (Moreira et al., 2020). O efeito tipo-ansiolítico de LQFM212 envolve as vias serotoninérgicas, receptores nicotínicos e sítio benzodiazepínico de receptores GABA_A e, interessante, sem alteração da função cognitiva (Moreira et al., 2020). Neste sentido, o presente trabalho se propõe a avaliar o possível efeito tipo-antidepressivo de LQFM212.

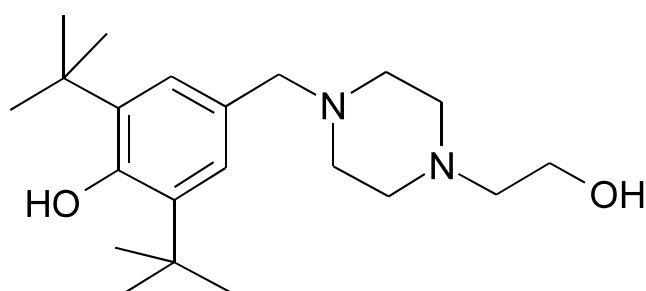


Figura 6. Estrutura química do derivado piperazínico LQFM212 - 2,6-di-*tert*-butil-4-((4-(2-hidroxietil)piperazina-1-*il*)metil)fenol.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito tipo-antidepressivo do derivado piperazínico LQFM212 e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 após tratamento por via oral com dose única ou doses repetidas por 15 dias;
- Investigar os mecanismos de ação envolvidos no efeito do composto LQFM212 utilizando diferentes antagonistas de receptores e inibidores enzimáticos relacionados as vias monoaminérgicas;
- Quantificar os níveis hipocámpais de BDNF após tratamento por via oral com LQFM212 em dose única ou doses repetidas por 15 dias;
- Monitorar o peso dos animais diariamente durante o tratamento por via oral com LQFM212 em doses repetidas por 15 dias;
- Verificar possíveis alterações bioquímicas relacionadas a função hepática e renal após o tratamento por via oral com LQFM212 em doses repetidas por 15 dias;
- Avaliar os efeitos comportamentais do tratamento oral com o composto LQFM212 no modelo de neuroinflamação induzida por LPS;
- Avaliar os efeitos do tratamento oral com o composto LQFM212 no modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS, pela contagem de células total e diferencial no exsudato pleural;
- Quantificar as citocinas pró- (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no exsudato pleural de animais tratados por via oral com LQFM212;
- Quantificar as citocinas pró- (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no soro, marcadores de estresse oxidativo pela análise da atividade da MPO, níveis de nitritos e de glutathione (GSH) no córtex pré-frontal ou hipocampo, bem como a atividade da enzima colinesterase (ChE) no cérebro total obtido de

animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS e tratados por via oral com LQFM212.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos utilizando camundongos adultos albinos *Swiss* machos com 6-8 semanas de idade e pesando entre 30-35 gramas. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás (UFG), mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum* e período de adaptação de no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Todas as manipulações ocorreram entre 08:00 e 16:00 horas. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFG com número de protocolo 118/19. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal e reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

3.2 Desenho experimental

Para avaliar o possível efeito-tipo antidepressivo do composto LQFM212 foram utilizados testes e modelos animais. Primeiramente, foi verificado o efeito do tratamento por via oral com LQFM212 no teste do nado forçado após dois protocolos de tratamento: dose única ou doses repetidas por 15 dias consecutivos. Na expectativa de compreender os possíveis mecanismos de ação do composto, também foram avaliados no teste do nado forçado os efeitos da administração oral de LQFM212 em dose única na presença de diferentes antagonistas e inibidores enzimáticos das vias monoaminérgicas. Ainda seguindo estes dois protocolos de tratamento, dose única ou doses repetidas, foi possível avaliar a influência da administração oral de LQFM212 sobre os níveis hipocâmpais de BDNF. Durante o tratamento por 15 dias, o peso dos animais foi monitorado diariamente e ao final do

15º dia foram coletadas amostras para verificação de possíveis efeitos adversos relacionados a função hepática e renal.

A ação do composto LQFM212 sob parâmetros inflamatórios foi avaliada utilizando modelos animais de inflamação sistêmica ou local. A inflamação sistêmica foi induzida por LPS, uma endotoxina capaz de gerar comportamentos doentio, tipo-ansioso e tipo-depressivo nos animais. Posteriormente, os animais foram avaliados em testes comportamentais específicos para estas atividades: teste do campo aberto, teste do nado forçado, teste da suspensão pela cauda. Ao final da avaliação comportamental, foram coletadas amostras de sangue para dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias; também foram coletados o córtex pré-frontal e hipocampo para avaliação de marcadores de estresse oxidativo e o cérebro total para avaliação da atividade da enzima ChE. Já a inflamação local foi avaliada pelo modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS, que permite avaliar a migração celular total e diferencial, atividade da enzima MPO e dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias no exsudato pleural.

3.3 Fármacos e reagentes

O composto LQFM212 (peso molecular - PM: 348,28 g/mol) foi sintetizado no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM - Faculdade de Farmácia, UFG) coordenado pelo professor Dr. Ricardo Menegatti, pelo método descrito anteriormente por Moreira et al., 2020. Todas as outras substâncias químicas foram obtidas de fornecedores comerciais padrão. Para o preparo do composto LQFM212 foi utilizado Tween 80® (polissorbato 80 - Sigma-Aldrich, EUA) a 2% para solubilização e posteriormente dissolvido em água destilada, como descrito anteriormente por Moreira et al., 2020, e administrado por via oral na dose de 54 µmol/kg com tratamento em dose única ou doses repetidas por 15 dias (1x ao dia). O grupo veículo foi tratado por via oral com Tween 80® a 2% em água destilada. Ao longo dos experimentos foram utilizados como controles positivos grupos de animais tratados com imipramina (54 µmol/kg - PM: 280,40 g/mol - Trofaniil® - Novartis, Brasil), buspirona (52 µmol/kg - PM: 385,50 g/mol - Ansitec® - Libbs, Brasil) ou dexametasona (5,1 µmol/kg - PM: 392,46 g/mol - Decadron® - Aché, Brasil), conforme a especificidade e necessidade em cada

experimento. Todos os três controles positivos foram dissolvidos em água destilada e administrados por via oral.

Os inibidores enzimáticos *p*-clorofenilalanina (PCPA; 500,9 µmol/kg - PM: 199,63 g/mol - Sigma-Aldrich, EUA) e α -metil-*p*-tirosina (AMPT; 512,2 µmol/kg - PM: 195,22 g/mol - Sigma-Aldrich, EUA) foram solubilizados em Tween 80® a 2% e posteriormente dissolvidos em solução salina 0,9%, e administrados por via intraperitoneal. Os antagonistas WAY-100635 (0,71 µmol/kg - PM: 422,56 g/mol - Sigma-Aldrich, EUA), propranolol (7,8 µmol/kg - PM: 259,34 g/mol - Brainfarma, Brasil), prazosina (2,6 µmol/kg - PM: 383,38 g/mol - Pfizer, Brasil), SCH-23390 (15 µg/kg = 0,05 µmol/kg - PM: 287,78 g/mol - Sigma-Aldrich, EUA) e sulpirida (146 µmol/kg - PM: 341,42 g/mol - Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em solução salina 0,9% e administrados por via intraperitoneal. O lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* 0111:B4 (LPS - Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvido em solução salina 0,9% e administrado por via intraperitoneal (1 mg/kg) ou intrapleural (250 ng/mL). A carragenina (solução a 1% - Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em solução salina 0,9% e administrada por via intrapleural. Todas as soluções foram administradas em um volume constante de 10 mL/kg e as doses utilizadas estão de acordo com dados da literatura (Detke et al., 1995; Sato et al., 2008; Teixeira et al., 2013; Florentino et al., 2017; Zhang et al., 2019; Moreira et al., 2020; Moreira et al., 2021).

3.4 Avaliação da atividade tipo-antidepressiva

3.4.1 Teste do nado forçado

A atividade tipo-antidepressiva do composto LQFM212 foi avaliada em uma versão modificada do teste de nado forçado, descrito anteriormente por Porsolt et al., 1977. Uma hora após os tratamentos, dose única ou doses repetidas por 15 dias (1x ao dia), por via oral com veículo, LQFM212 (54 µmol/kg) ou imipramina (54 µmol/kg) os animais (n=8; dose única e n=5; doses repetidas) foram colocados individualmente para nadar em um recipiente cilíndrico (32 cm de altura e 14 cm de diâmetro) com água. Todo o experimento foi filmado durante sessões de 6 minutos para posterior avaliação comportamental. Os parâmetros avaliados foram a latência à imobilidade (tempo para o animal parar de se mover), tempo de imobilidade (tempo em que os

animais ficam imóveis ou fazem apenas movimentos necessários para manter a cabeça acima da água), tempo de nado (movimenta as patas dianteiras horizontalmente) e tempo de escalada (movimentos com as patas na parede do cilindro). Os parâmetros avaliados neste teste são direcionados para mensurar o desespero comportamental dos animais, de modo geral, é possível avaliar dois tipos principais de comportamentos alternados, a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade, referida como a desistência de fugir da situação estressante (Thierry et al., 1984; Machado, 2012; Borges-Filho, 2014; Costa, 2021). Fármacos que reduzem o tempo de imobilidade e/ou aumentam a latência à imobilidade são considerados como substâncias com efeito tipo-antidepressivo (Porsolt et al., 1977; Teixeira-Silva et al., 2006).

3.4.2 Envolvimento das vias monoaminérgicas

Nesta seção experimental, uma série de análises foram realizadas para investigar a possível participação das vias monoaminérgicas na atividade tipo-antidepressiva do composto LQFM212, usando a administração prévia de antagonistas para receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, receptores α_1 - e β -adrenérgicos e receptores dopaminérgicos tipo D₁ e D₂. Além disso, também foi avaliado o envolvimento das monoaminas endógenas pela administração prévia de inibidores das enzimas triptofano hidroxilase e tirosina hidroxilase.

3.4.2.1 Participação dos receptores serotoninérgicos

Para verificar a participação dos receptores serotoninérgicos, os animais (n=8) foram pré-tratados por via intraperitoneal com salina 0,9% ou WAY-100635 (0,71 μ mol/kg, um antagonista do receptor 5-HT_{1A}), e após trinta minutos os animais foram tratados por via oral com veículo ou LQFM212 (54 μ mol/kg). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

3.4.2.2 Participação da serotonina endógena

Para verificar a influência da serotonina endógena, os animais (n=8) foram pré-tratados por via intraperitoneal com salina 0,9% ou PCPA (500 $\mu\text{mol/kg}$, um inibidor da enzima triptofano hidroxilase) uma vez por dia durante 4 dias consecutivos. Uma hora após o último pré-tratamento, os animais foram tratados por via oral com veículo ou LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

3.4.2.3 Participação dos receptores noradrenérgicos

Para verificar a participação dos receptores noradrenérgicos, os animais (n=8) foram pré-tratados por via intraperitoneal com salina 0,9%, prazosina (2,6 $\mu\text{mol/kg}$, um antagonista do receptor α_1) ou propranolol (7,8 $\mu\text{mol/kg}$, um antagonista não seletivo de receptores β), e após 15 minutos os animais foram tratados por via oral com veículo ou LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

3.4.2.4 Participação dos receptores dopaminérgicos

Para verificar a participação dos receptores dopaminérgicos, os animais (n=8) foram pré-tratados por via intraperitoneal com salina 0,9%, SCH-23390 (15 $\mu\text{g/kg}$, um antagonista do receptor D_1) ou sulpirida (146 $\mu\text{mol/kg}$, um antagonista dos receptores D_2 e D_3), e após 30 minutos os animais foram tratados por via oral com veículo ou LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

3.4.2.5 Participação das catecolaminas endógenas

Para verificar a influência das catecolaminas endógenas, noradrenalina e dopamina, os animais (n=8) foram pré-tratados por via intraperitoneal com salina 0,9% ou AMPT (512 $\mu\text{mol/kg}$, um inibidor da enzima tirosina hidroxilase), e após 4 horas os

animais foram tratados por via oral com veículo ou LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$). Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

3.4.3 Quantificação dos níveis hipocampais de BDNF

Nesta seção, foram realizados dois protocolos experimentais: i) os animais receberam, por via oral, uma dose única de veículo, LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) ou imipramina (54 $\mu\text{mol/kg}$), uma hora antes da quantificação; ii) os animais foram tratados, por via oral, uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos com os mesmos tratamentos acima. Após ambos os protocolos, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado e imediatamente após a avaliação comportamental foram submetidos à eutanásia por decapitação e os hipocampus foram extraídos, sendo utilizados nesta quantificação $n=5/\text{grupo}$ com escolha randômica, e em duplicata. Para dissecação dos hipocampus, os cérebros foram colocados sobre uma barra de gelo reutilizável coberta com papel filtro umedecido com solução salina 0,9%. Em seguida, os cérebros foram seccionados longitudinalmente e os hipocampus foram removidos com a ajuda de um pincel de pelo fino, e foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia da análise bioquímica.

A preparação e dosagem das amostras foram realizadas seguindo as instruções do fabricante do kit comercial de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Boster Immunoleader, nº: EK0309). O tecido do hipocampo foi suspenso em tampão de lise [Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, Triton-X 100 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, inibidores de fosfatase/protease (Thermo Scientific, #1861281) e PMSF 1 mM] na proporção de 1:10 (p/v) e homogeneizado individualmente, sendo as amostras mantidas em gelo todo o período. O homogeneizado tecidual foi mantido em agitador shaker a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos e o sobrenadante coletado para a dosagem de BDNF.

A quantidade total de proteínas do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford, 1976, utilizando albumina de soro bovino para a construção da curva padrão. Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação com a curva padrão, utilizando-se os valores obtidos no ensaio colorimétrico, medido a 450 nm em um leitor de placas ELISA. Todos os resultados foram expressos em picogramas de BDNF por miligrama de proteína.

3.4.4 Avaliação de possíveis alterações indicativas de efeitos adversos

Todos os animais (n=5) de cada grupo de tratamento por via oral com doses repetidas de veículo, LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) ou imipramina (54 $\mu\text{mol/kg}$) por 15 dias (1x ao dia) foram monitorados diariamente para sinais de toxicidade. O ganho ou perda de peso foi calculado diariamente pela diferença de peso entre o primeiro dia de tratamento. Ao final do tratamento, no dia 15, imediatamente após o teste comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, sendo o fígado coletado para quantificação de glutathiona (GSH), e o sangue para quantificação sérica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina.

3.4.4.1 Quantificação dos níveis de GSH no fígado

O ensaio foi baseado no método de DTNB (5,5-dithio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) - reagente de Ellman) (Baker et al., 1990). Após a coleta do fígado, rapidamente foi preparado um homogenato (1g de tecido/4 mL de tampão de fosfato monossódico/dissódico 0,1 M pH 7,4) com auxílio de aparelho homogeneizador de tecido ULTRA-TURRAX. Para a desproteínização, 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) frio a 50% foram adicionados a 950 μL do homogenato, depois centrifugado a 10.000 rpm, 4 °C durante 10 minutos para coleta do sobrenadante. Uma alíquota de 50 μL do sobrenadante foi adicionada a 850 μL de tampão de fosfato monossódico/dissódico 0,2 M pH 8,2 e 100 μL DTNB 6 mM. A absorvância foi medida 1 minuto após a adição do sobrenadante a 412 nm em espectrofotômetro (Kowalczyk-Pachel et al., 2016). Os resultados foram expressos em μmol de GSH por g de tecido, a partir da interpolação com a curva padrão de GSH 1 mM.

3.4.4.2 Determinação dos indicadores de função hepática e renal

Para a análise experimental da função hepática e renal, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm, 4 °C durante 5 minutos para obtenção do soro utilizado nos ensaios bioquímicos. Os parâmetros bioquímicos analisados no soro incluem os níveis de AST e ALT como indicadores da função hepática e os níveis de

ureia e creatinina como indicadores da função renal. Estes parâmetros foram quantificados por métodos enzimáticos utilizando kits comerciais (Dóles reagentes, Brasil). Os resultados foram calculados e expressos de acordo com as especificações de cada kit.

3.5 Modelo de neuroinflamação induzida por LPS

Nesta seção experimental, os animais (n=9) foram divididos randomicamente em seis grupos (**Figura 7A**). Um dia antes das avaliações comportamentais, os animais foram pré-tratados com salina 0,9% ou LPS (1 mg/kg) por via intraperitoneal, baseado no protocolo descrito por Casaril et al., 2019. Após 23 horas de pré-tratamento, os animais foram tratados com veículo, LQFM212 (54 μ mol/kg) ou buspirona (52 μ mol/kg). Uma hora após, os animais foram submetidos aos testes comportamentais para verificar a atividade exploratória e tipo-antidepressiva (**Figura 7B**). Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para a coleta de sangue e amostras de cérebro para as dosagens bioquímicas. Para quantificação de citocinas no soro e avaliação de marcadores de estresse oxidativo no córtex pré-frontal e hipocampo foi utilizado n=6/grupo com escolha randômica, e em duplicata. Para avaliação da atividade da enzima ChE no cérebro total foi utilizado n=3/grupo com escolha randômica, e em triplicata.

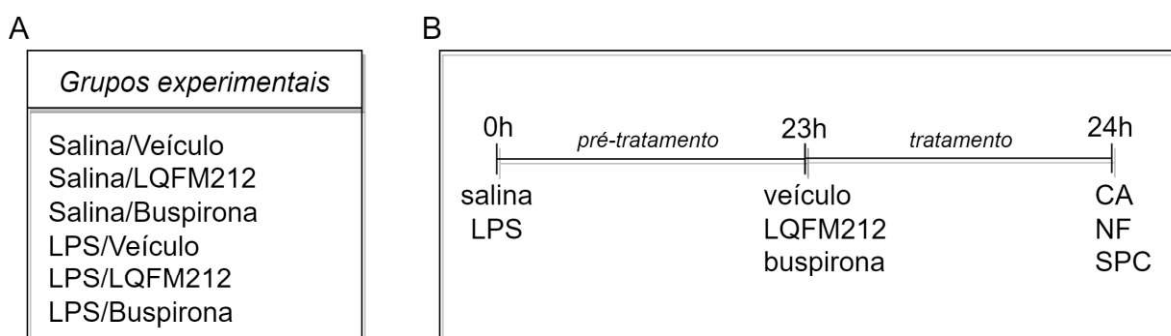


Figura 7. Representação esquemática do modelo de neuroinflamação induzida por LPS. Nesta seção experimental foram utilizados 9 animais por grupo. CA, teste do campo aberto; LPS, lipopolissacarídeo; NF, teste do nado forçado; SPC, teste da suspensão pela cauda.

3.6 Avaliação comportamental no modelo de neuroinflamação

3.6.1 *Teste do campo aberto*

O teste do campo aberto fornece uma variedade de informações comportamentais, desde a capacidade exploratória e locomotora geral até dados relativos à emocionalidade dos animais (Walsh; Cummins, 1976; Iravani et al., 2002; Seibenhener; Wooten, 2015). O aparato denominado de campo aberto consiste em uma arena circular de acrílico (20 cm de altura e 36 cm de diâmetro), com piso na cor preta e dividido em oito áreas iguais, e paredes de altura suficiente para impedir a fuga no animal. Após a sequência experimental descrita no item 3.5, os animais (n=9) foram colocados, individualmente, no centro do campo aberto. Todo o experimento é realizado em ambiente com iluminação controlada (luz vermelha), sendo as sessões filmadas para posterior análise comportamental. Levando em consideração que os animais são expostos a um ambiente novo, a tendência natural do animal em um novo local é a de explorá-lo (Montgomery, 1958; Archer, 1973), e podem apresentar um comportamento denominado de tigmotaxia, assim, por instinto, se locomovem perto das paredes (periferia) onde se sentem mais protegidos (Dollinger et al., 1980; Gould et al., 2009; Campos et al, 2013; Seibenhener; Wooten, 2015). A atividade exploratória dos animais foi observada durante sessões de 5 minutos e os parâmetros avaliados durante este período foram o número total de áreas invadidas (avaliado pela quantidade de linhas cruzadas com as quatro patas), frequência de levantadas, tempo de imobilidade, frequência de autolimpeza, percentual de linhas cruzadas e de tempo despendido na área central (%CrCentro e %TCentro, respectivamente) (Formigoni et al., 2006).

3.6.2 *Teste do nado forçado*

Com este teste é possível avaliar a atividade tipo-antidepressiva. Após a sequência experimental descrita no item 3.5, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. Neste teste, os animais (n=9) foram colocados individualmente para nadar em um recipiente cilíndrico, e avaliados conforme descrito no item 3.4.1.

3.6.3 Teste da suspensão pela cauda

O teste da suspensão pela cauda também foi para avaliar a atividade tipo-antidepressiva, e semelhante ao que é observado no teste do nado forçado há uma tentativa de fuga no início, e não obtendo êxito o animal assume uma postura imóvel (Cryan et al., 2002; Teixeira-Silva et al., 2006). Após a sequência experimental descrita no item 3.5, os animais (n=9) foram suspensos pela cauda, cerca de 50 cm do chão, com o auxílio de uma fita adesiva colocada a 1-2 cm da ponta da cauda e avaliados durante sessões de 6 minutos. Toda a sessão foi filmada, sendo registrada a latência à imobilidade e o tempo total de imobilidade de cada animal.

3.7 Modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS

Neste teste, os animais (n=9) foram tratados por via oral com veículo, LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) ou dexametasona (5,1 $\mu\text{mol/kg}$). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma injeção de 100 μL de salina 0,9%, carragenina a 1% ou LPS (250 ng/mL) na cavidade pleural. Quatro horas depois, o exsudato pleural foi coletado com 1 mL de tampão PBS heparinizado (20 U.I./mL) (Sousa et al., 2010; Florentino et al., 2017). Uma alíquota foi usada para determinar o conteúdo total de leucócitos usando líquido de Turk em uma câmara de Neubauer, e a outra alíquota foi usada para a contagem diferencial dos leucócitos em células mononucleares e polimorfonucleares. Os resultados das contagens total e diferencial foram expressos como o número absoluto de células totais e cada tipo de célula, respectivamente. Os resultados também foram ajustados de acordo com a unidade de volume utilizada na avaliação realizada e foram expressos como número de leucócitos $\times 10^6/\text{mL}$. Além disso, a outra alíquota de exsudato pleural foi usada para determinar a atividade da enzima MPO e para quantificar os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

3.8 Avaliação bioquímica após os modelos de neuroinflamação ou pleurisia

As amostras coletadas após os modelos *in vivo* foram utilizadas para as análises bioquímicas. As amostras de sangue dos animais submetidos ao modelo de

neuroinflamação induzida por LPS foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para obtenção do soro, o qual foi armazenado a -80 °C até ao dia de quantificação de citocinas pró- (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). Os níveis destas citocinas no exsudado pleural também foram quantificados após o modelo pleurisia induzida por carragenina ou LPS, e para isso as amostras de exsudado foram centrifugadas a 4000 rpm durante 4 minutos a 4 °C imediatamente antes da adição das amostras na placa. A atividade enzimática da MPO também foi analisada no exsudado pleural. As amostras de cérebro, hipocampo ou córtex pré-frontal, dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS foram utilizadas para quantificação dos níveis de nitritos e glutathiona (GSH) e atividade da enzima MPO. O cérebro total foi usado para avaliar a atividade da enzima colinesterase (ChE). Os homogenatos dessas áreas cerebrais foram preparados com auxílio de um micro homogeneizador motorizado, considerando 1 g de cada amostra para 10 mL de tampão, sendo utilizado tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 para hipocampo ou córtex pré-frontal e tampão fosfato de sódio 12,5 mM pH 7,0, NaCl 400 mM para o cérebro total. Para normalizar os resultados, a concentração total de proteínas foi medida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina de soro bovino.

3.8.1 Dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias

O soro dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS e o exsudato pleural obtido a partir do modelo de pleurisia foram utilizados para a dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10. Todas as citocinas foram quantificadas utilizando kits comerciais de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (Ebioscience), e em duplicata, utilizando n=6/grupo com escolha com escolha randômica (Florentino et al., 2017). Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.8.2 Atividade da enzima MPO

A atividade enzimática da MPO foi medida em amostras de cérebro, córtex pré-frontal ou hipocampo, de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida

por LPS ou exsudado pleural obtido do modelo pleurisia. Usando n=6/grupo com escolha randômica, 40 µL de homogenato do córtex pré-frontal ou hipocampo, ou exsudado pleural foram transferidos para Eppendorf's. A reação foi iniciada pela adição de 360 µL de tampão PBS pH 6,0 contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina 2 HCl e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A reação enzimática foi interrompida após 15 minutos, adicionando-se 30 µL de ázida de sódica a 1%. Depois disso, 200 µL foram transferidos para poços de uma microplaca, em duplicata, e a absorbância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm (Sedgwick, 1995; Saleh, et al., 1999). Os resultados foram expressos como atividade enzimática em mU/mL.

3.8.3 Níveis de nitritos

Para determinar a produção de óxido nítrico (NO), o ensaio foi baseado na reação de Griess (Green et al., 1982). Usando n=6/grupo com escolha randômica, o homogenato de córtex pré-frontal ou hipocampo foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi separado. Em seguida, 75 µL de sobrenadante de cada área foram incubados com 75 µL do reagente Griess à temperatura ambiente durante 10 minutos. A absorvância foi medida a 560 nm em um leitor de microplaca. O conteúdo de nitritos foi determinado a partir de uma curva padrão de nitritos gerada utilizando NaNO₂ (variando de 0,75 a 100 µM) como padrão e os resultados foram expressos em µM/g de tecido (Lopes et al., 2018).

3.8.4 Níveis de GSH

O ensaio foi baseado na reação do reagente de Ellman (DTNB) com grupos de tiol livre (Sedlack; Lindsay, 1968). Usando n=6/grupo com escolha randômica, adicionou-se uma solução a 50% de ácido tricloroacético ao homogenato de córtex pré-frontal ou hipocampo (1:10 v/v), depois foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante de cada área foi separado. Para determinar os níveis de GSH, 50 µL de sobrenadante foram misturados com 100 µL de tampão Tris-HCl 0,4M pH 8,9 e 5 µL de DTNB 0,01M. A cor resultante foi imediatamente lida a 405 nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram

calculados com base em uma curva padrão de glutathiona (variando de 30 a 1000 µg/mL) e expressos como µg de GSH/g de tecido.

3.8.5 Atividade da enzima ChE

A atividade enzimática da ChE foi determinada com um método colorimétrico, baseado no método anteriormente descrito por Ellman et al., 1961, com algumas modificações. Utilizando n=3/grupo com escolha randômica, o homogenato de cérebro total dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para separar o sobrenadante, usado como fonte de enzima para o ensaio. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 220 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,0, 2 µL de iodeto de acetiltiocolina 75 mM e 5 µL de reagente de Ellman tamponado (DTNB e bicarbonato de sódio 15 mM), seguido de incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos antes da adição de 20 µL de sobrenadante (fonte da enzima) com leitura imediata da absorbância a 405 nm. Foram realizadas oito leituras com intervalos de 40 segundos durante aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram obtidos foram realizados em triplicata e expressos como densidade óptica/mg de proteína.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias (EPM). Após análise dos resultados no teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, as diferenças entre dois grupos foram detectadas pelo teste-*t* e entre três ou mais grupos pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Newman-Keuls, ou ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. O teste estatístico utilizado em cada análise foi descrito nas legendas das figuras. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade tipo-antidepressiva

4.1.1 Teste do nado forçado

Neste teste, em ambos os protocolos de tratamento, todas as análises foram realizadas em comparação com o grupo tratado com veículo, incluindo o controle positivo, imipramina, que foi utilizado para confirmar que o teste estava funcionando e era capaz de detectar a atividade tipo-antidepressiva do composto LQFM212. O tratamento em dose única com LQFM212 ou imipramina diminuiu o tempo de imobilidade em 16% ($p<0,01$) e 29% ($p<0,001$) (**Figura 8B**) e aumentou a latência para imobilidade em 32% ($p<0,01$) e 42% ($p<0,01$), o tempo de nado em 35% ($p<0,001$) e 55% ($p<0,01$) e o tempo de escalada em 43% ($p<0,01$) e 75% ($p<0,01$) (**Figuras 8A, 8C e 8D**) quando comparado com o grupo tratado com veículo ($223,80 \pm 7,13$; $66,85 \pm 3,27$; $78,59 \pm 4,17$; $44,19 \pm 2,51$ s). Já o tratamento repetido por 15 dias com LQFM212 ou imipramina diminuiu o tempo de imobilidade em 27% ($p<0,001$) e 46% ($p<0,001$) (**Figura 9B**) e aumentou a latência para imobilidade em 50% ($p<0,01$) e 70% ($p<0,01$), o tempo de nado em 91% ($p<0,001$) e 98% ($p<0,001$) e o tempo de escalada em 93% ($p<0,05$) e 324% ($p<0,001$) (**Figuras 9A, 9C e 9D**) quando comparado com o grupo tratado com veículo ($263,60 \pm 4,90$; $51,48 \pm 4,68$; $74,14 \pm 3,00$; $21,54 \pm 4,66$ s).

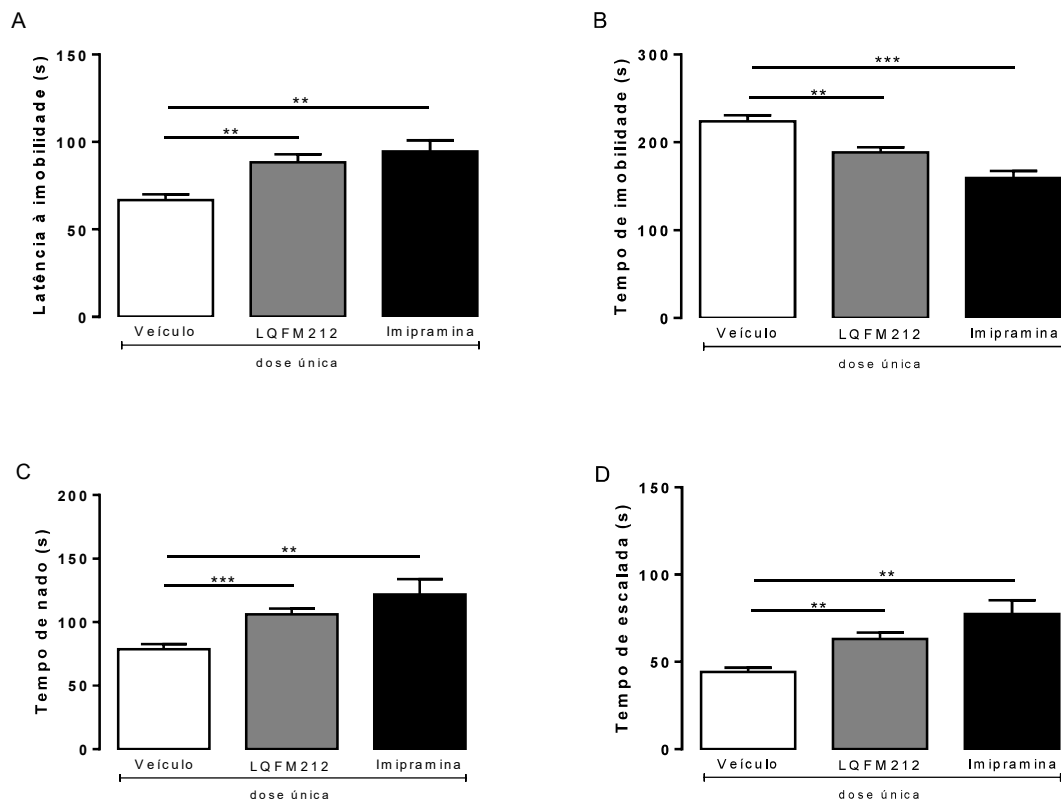


Figura 8. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral. As barras verticais representam a média $\pm$ EPM (n=8) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. Imipramina (54 $\mu\text{mol/kg}$) foi utilizada no teste como controle positivo. **p<0,01 e ***p<0,001 – comparado com o grupo tratado com veículo (10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste Newman-Keuls.

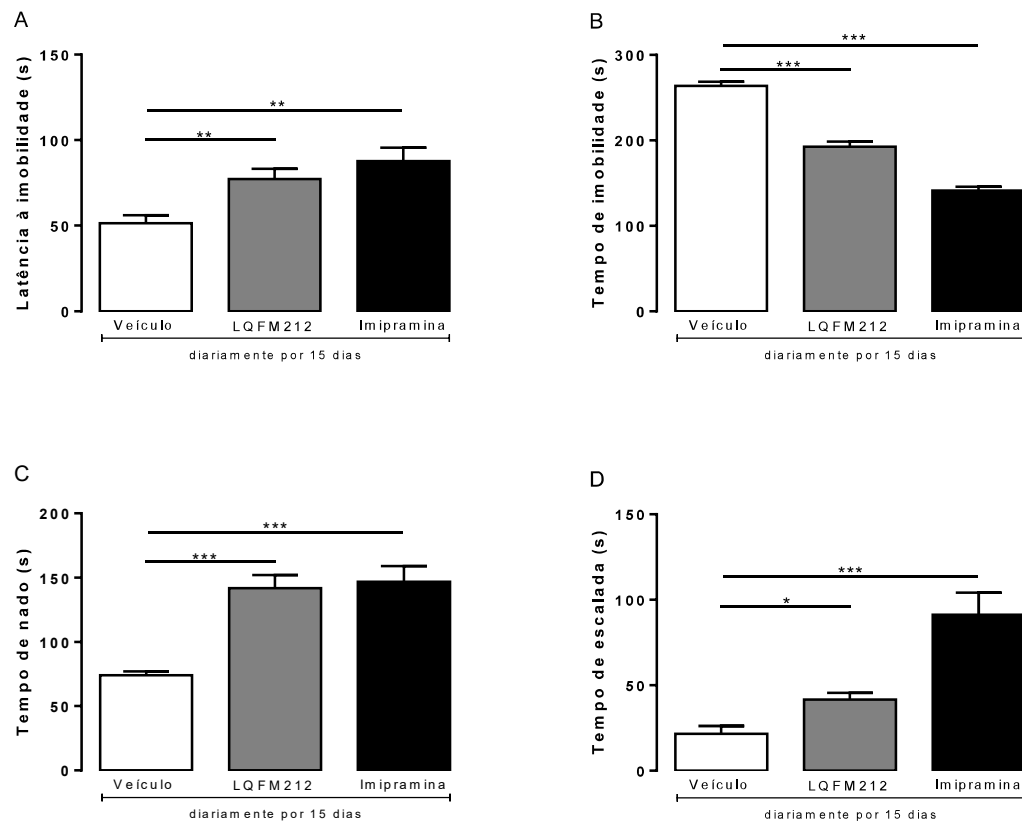


Figura 9. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 15 dias de tratamento por via oral (1x ao dia). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=5$) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. Imipramina (54 $\mu\text{mol/kg}$) foi utilizada no teste como controle positivo. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ – comparado com o grupo tratado com veículo (10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste Newman-Keuls.

4.1.2 Envolvimento das vias monoaminérgicas

4.1.2.1 Participação dos receptores serotoninérgicos

O efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 [(Figura 10) salina/veículo vs salina/LQFM212] no teste do nado forçado, após administração em dose única, foi revertido na presença do antagonista WAY-100635 [(Figura 10) salina/LQFM212 vs WAY-100635/LQFM212]. A reversão foi demonstrada pela redução do tempo de latência à imobilidade em 33% [Figura 10A ($p < 0,001$)], aumento do tempo de imobilidade em 30% [Figura 10B ($p < 0,01$)], redução do tempo de nado em 39% [Figura 10C ($p < 0,001$)] e redução do tempo de escalada em 47% [(Figura 10D ($p < 0,05$)). O pré-tratamento com WAY-100635 *per se* não alterou nenhum dos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo [(Figura 10 salina/veículo vs WAY-100635/veículo].

4.1.2.2 Participação da serotonina endógena

O efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 [(Figura 11) salina/veículo vs salina/LQFM212] no teste do nado forçado, após administração em dose única, foi revertido na presença do inibidor enzimático PCPA [(Figuras 11A, 11B e 11C) salina/LQFM212 vs PCPA/LQFM212]. A reversão foi demonstrada pela redução do tempo de latência à imobilidade em 31% [Figura 11A ($p < 0,001$)], aumento do tempo de imobilidade em 23% [Figura 11B ($p < 0,01$)] e redução do tempo de nado em 36% [Figura 11C ($p < 0,001$)]. O pré-tratamento com PCPA *per se* não alterou nenhum dos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo [(Figura 11 salina/veículo vs PCPA/veículo].

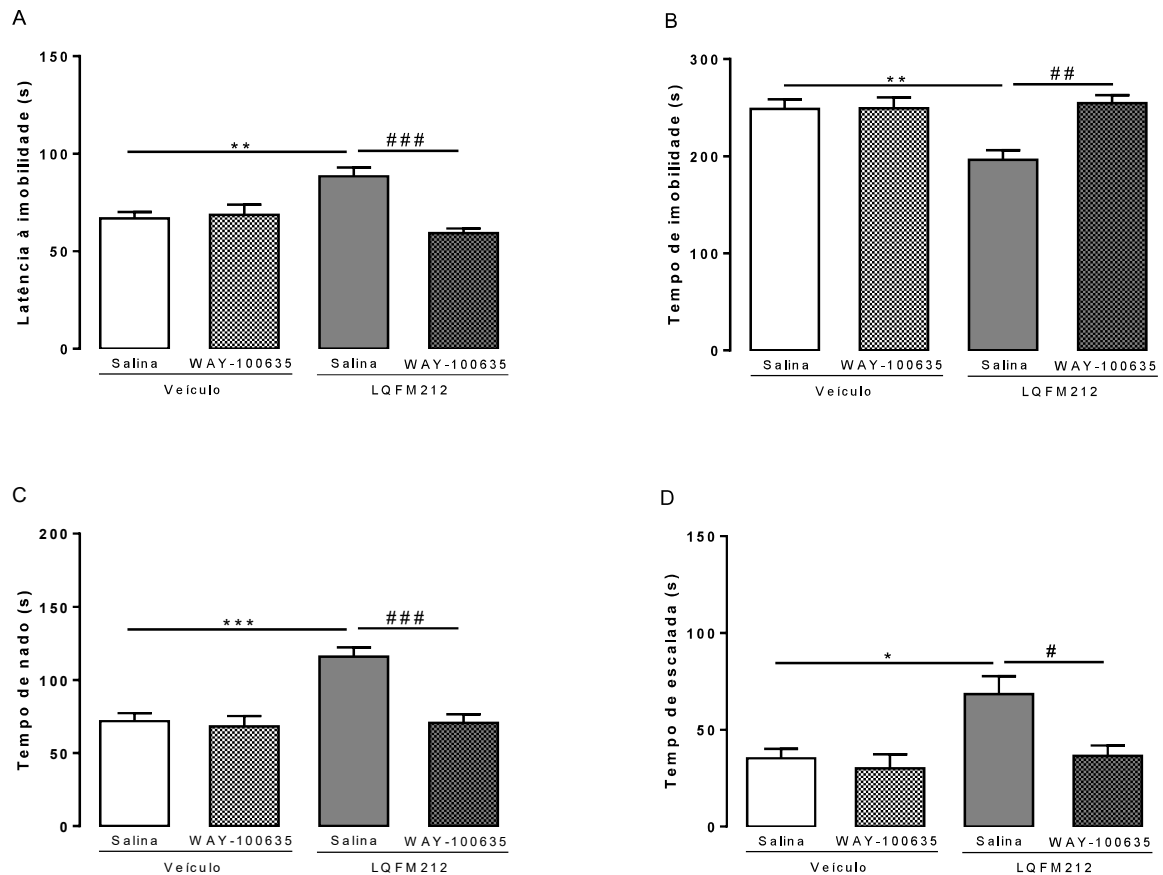


Figura 10. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, WAY-100635 (0,71 $\mu\text{mol/kg}$). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM (n=8) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. *p<0,05, **p<0,01 e *p<0,001 – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 – comparado com o grupo LQFM212 (salina 0,9% + LQFM212 54 $\mu\text{mol/kg}$) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.**

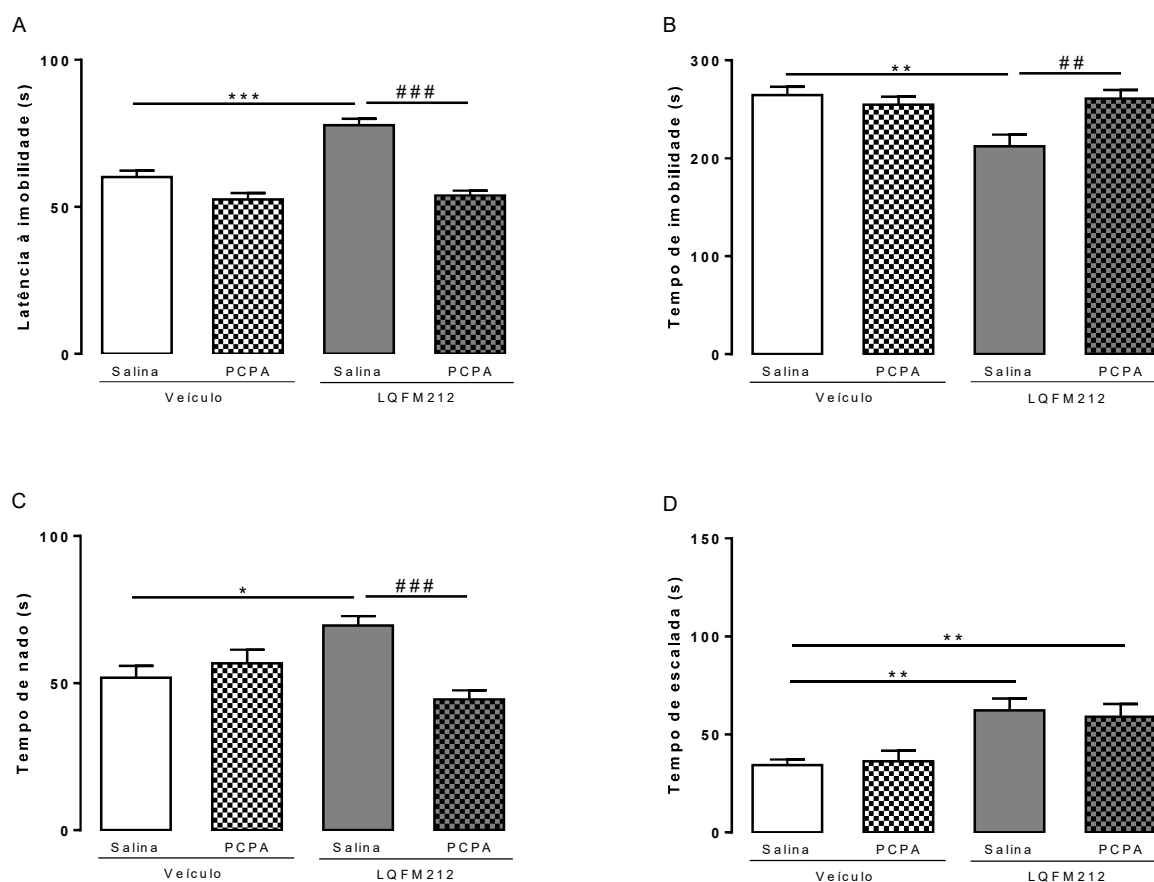


Figura 11. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do inibidor da enzima triptofano hidroxilase, PCPA (500 $\mu\text{mol/kg}$). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=8$) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e * $p<0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$ – comparado com o grupo LQFM212 (salina 0,9% + LQFM212 54 $\mu\text{mol/kg}$) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. PCPA, *p*-clorofenilalanina.**

4.1.2.3 Participação dos receptores noradrenérgicos

O efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 [(**Figura 12**) salina/veículo vs salina/LQFM212] no teste do nado forçado, após administração em dose única, foi revertido na presença do antagonista prazosina [(**Figuras 12B e 12C**) salina/LQFM212 vs prazosina/LQFM212]. A reversão foi demonstrada pelo aumento do tempo de imobilidade em 26% [**Figura 12B** ($p < 0,01$)] e redução do tempo de nado em 30% [**Figura 12C** ($p < 0,05$)]. Por outro lado, o pré-tratamento com propranolol não reverteu o efeito-tipo antidepressivo do composto LQFM212 [(**Figura 13**) salina/LQFM212 vs propranolol/LQFM212] no teste do nado forçado. O pré-tratamento com prazosina ou propranolol *per se* não alteraram nenhum dos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo [(**Figura 12**) - salina/veículo vs prazosina/veículo; (**Figura 13**) - salina/veículo vs propranolol/veículo]

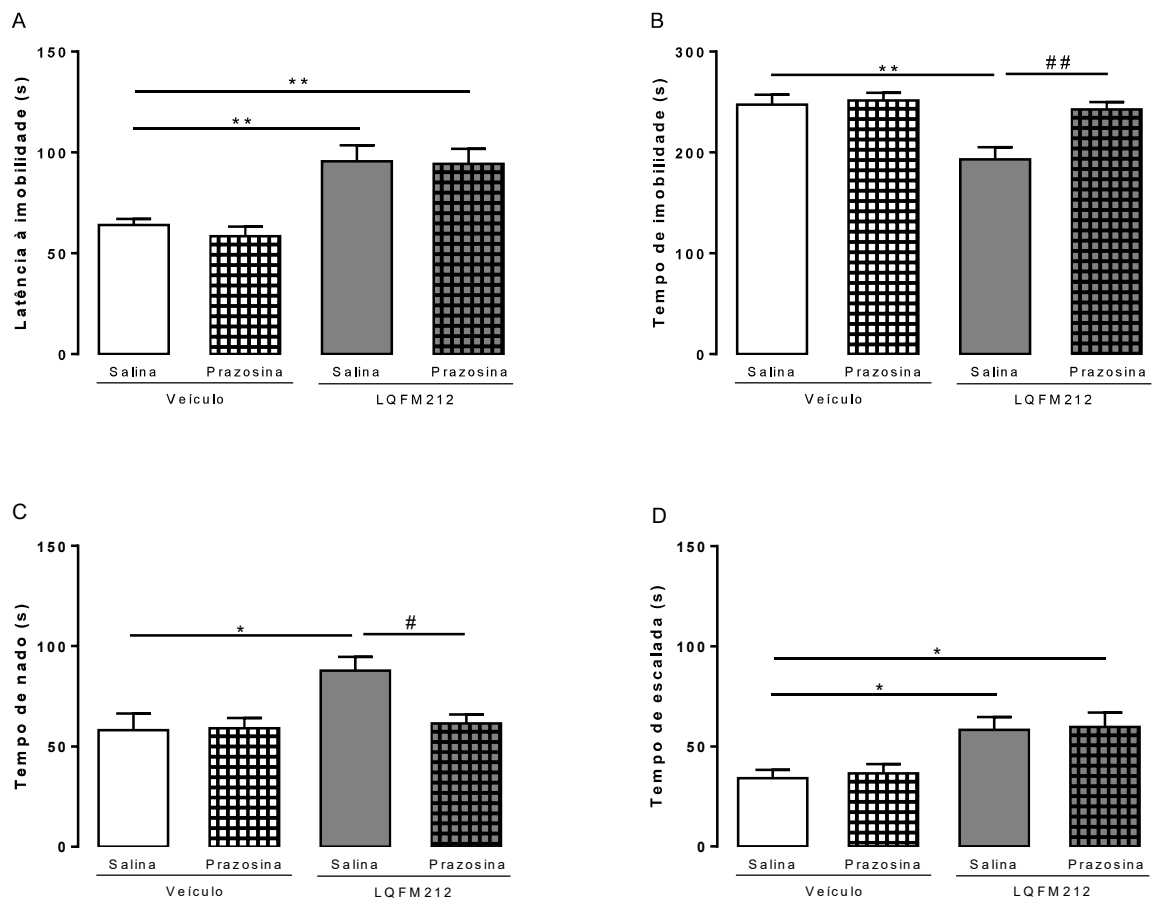


Figura 12. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista do receptor α_1 -adrenérgico, prazosina (2,6 $\mu\text{mol/kg}$). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=8$) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e # $p<0,05$ e ## $p<0,01$ – comparado com o grupo LQFM212 (salina 0,9% + LQFM212 54 $\mu\text{mol/kg}$) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

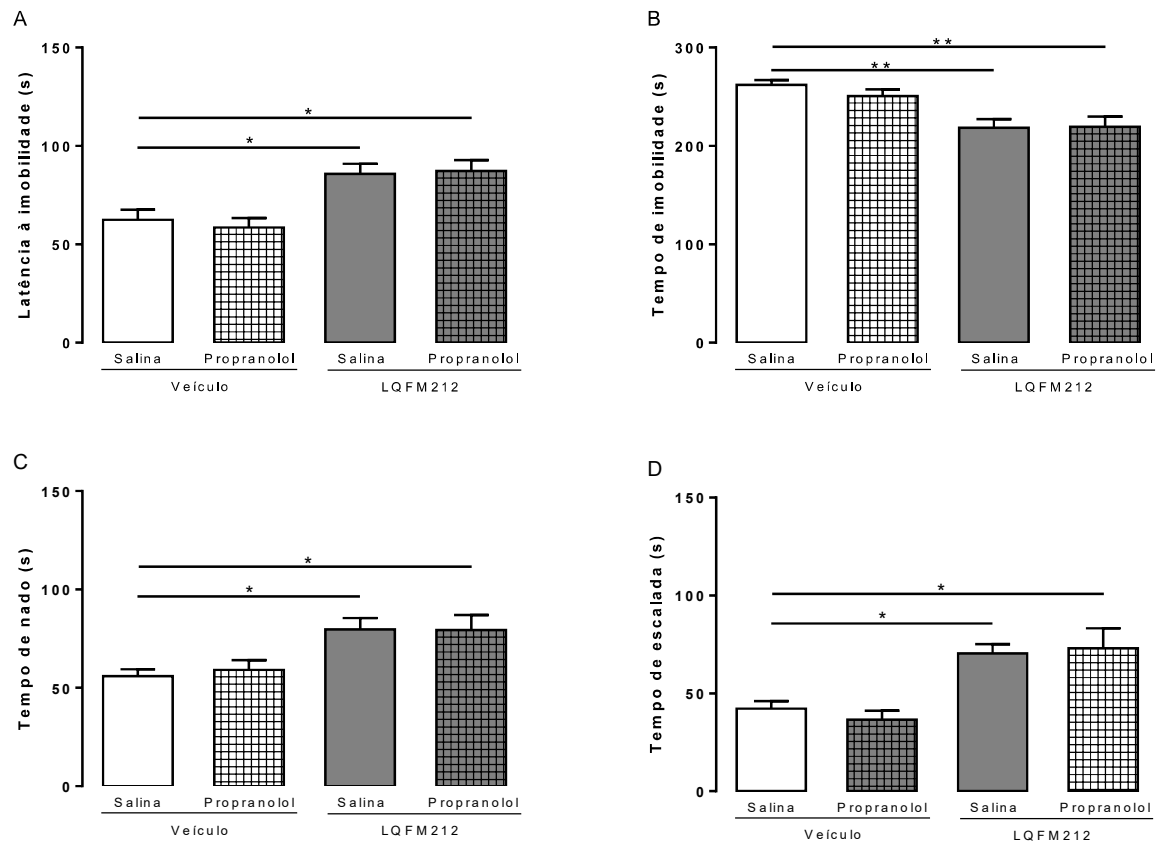


Figura 13. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral na ausência ou na presença do antagonista não-seletivo do receptor β -adrenérgico, propranolol (7,8 $\mu\text{mol/kg}$). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=8$) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

4.1.2.4 Participação dos receptores dopaminérgicos

O efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 [(Figuras 14 e 15) salina/veículo vs salina/LQFM212] no teste do nado forçado, após administração em dose única, foi revertido na presença do antagonista SCH-23390 [(Figura 14) salina/LQFM212 vs SCH-23390/LQFM212] e do antagonista sulpirida [(Figura 15) salina/LQFM212 vs sulpirida/LQFM212]. A reversão pelo pré-tratamento com SCH-23390 foi demonstrada pela redução do tempo de latência à imobilidade em 23% [Figura 14A ($p<0,01$)], aumento do tempo de imobilidade em 21% [Figura 14B ($p<0,01$)], redução do tempo de nado em 36% [Figura 14C ($p<0,01$)] e redução do tempo de escalada em 51% [Figura 14D ($p<0,01$)]. Já a reversão pelo pré-tratamento com sulpirida pela redução do tempo de latência à imobilidade em 34% [Figura 15A ($p<0,001$)], aumento do tempo de imobilidade em 30% [Figura 15B ($p<0,001$)], redução do tempo de nado em 41% [Figura 15C ($p<0,001$)] e redução do tempo de escalada em 72% [Figura 15D ($p<0,001$)]. O pré-tratamento com SCH-23390 ou com sulpirida *per se* não alterou nenhum dos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo [(Figura 14) - salina/veículo vs SCH-23390/veículo; (Figura 15) - salina/veículo vs sulpirida/veículo].

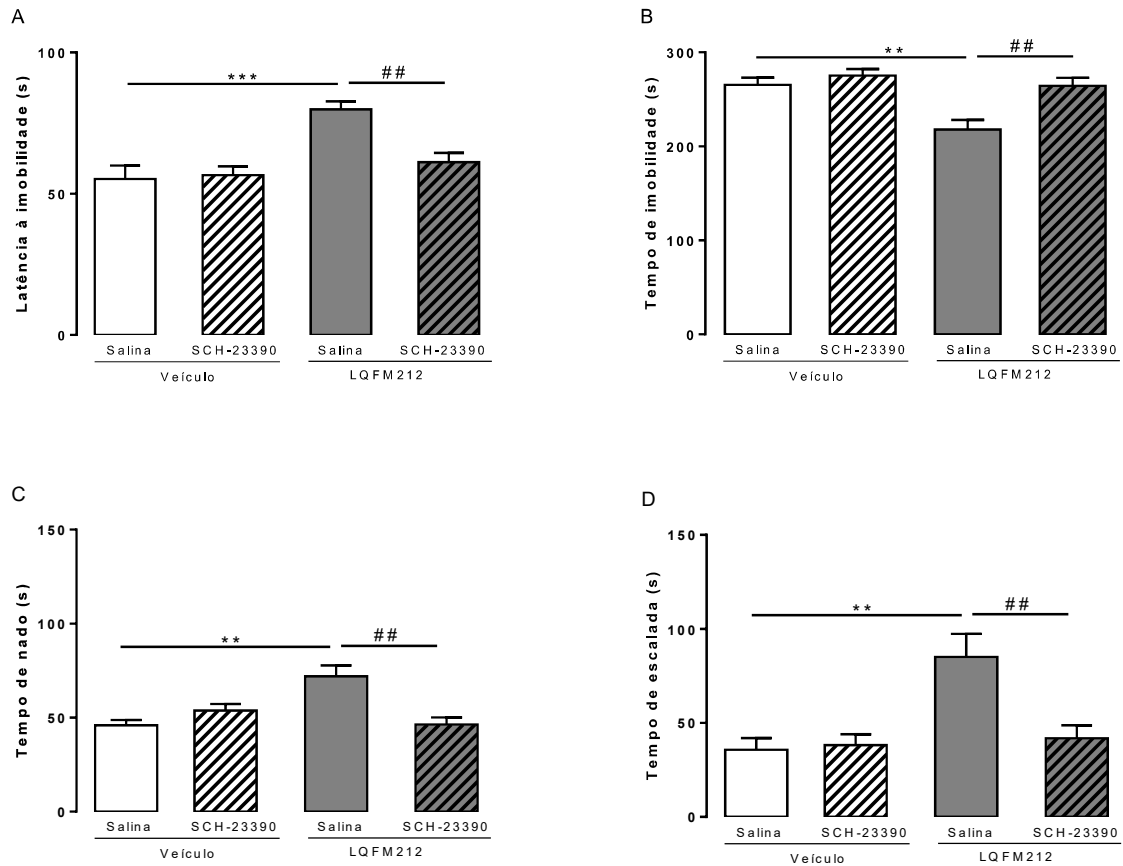


Figura 14. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista do receptor dopaminérgico D_1 , SCH-23390 (15 $\mu\text{g/kg}$). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=8$) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. $p<0,01$ e $***p<0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e $##p<0,01$ – comparado com o grupo LQFM212 (salina 0,9% + LQFM212 54 $\mu\text{mol/kg}$) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.**

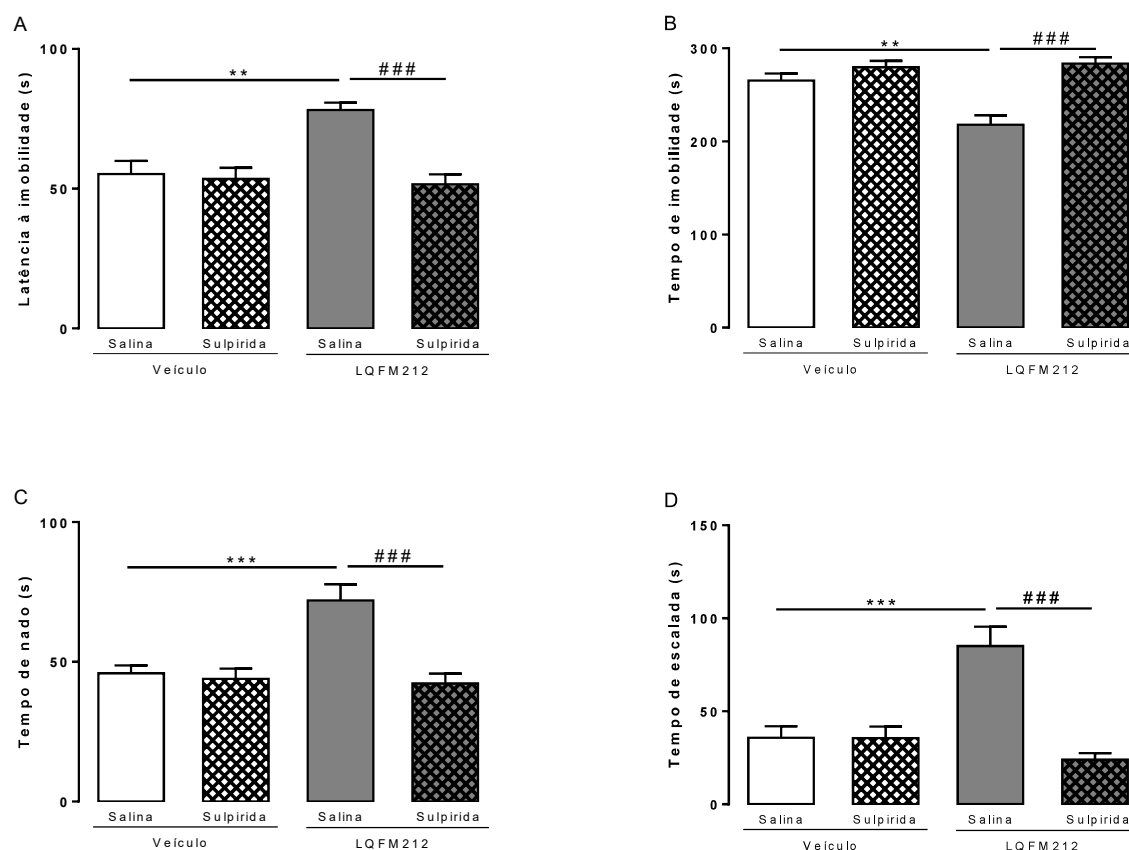


Figura 15. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do antagonista dos receptores dopaminérgicos D_2 e D_3 , sulpirida (146 $\mu\text{mol/kg}$). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=8$) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. ** $p<0,01$ e * $p<0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e #### $p<0,001$ – comparado com o grupo LQFM212 (salina 0,9% + LQFM212 54 $\mu\text{mol/kg}$) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.**

4.1.2.5 Participação das catecolaminas endógenas

O efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 [(Figura 16) salina/veículo vs salina/LQFM212] no teste do nado forçado, após administração em dose única, foi revertido na presença do inibidor enzimático AMPT [(Figura 16) salina/LQFM212 vs AMPT/LQFM212]. A reversão foi demonstrada pela redução do tempo de latência à imobilidade em 39% [Figura 16A ($p < 0,001$)], aumento do tempo de imobilidade em 38% [Figura 16B ($p < 0,001$)], redução do tempo de nado em 33% [Figura 16C ($p < 0,05$)] e redução do tempo de escalada em 72% [Figura 16D ($p < 0,001$)]. O pré-tratamento com AMPT *per se* não alterou nenhum dos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo [(Figura 16) salina/veículo vs AMPT/veículo].

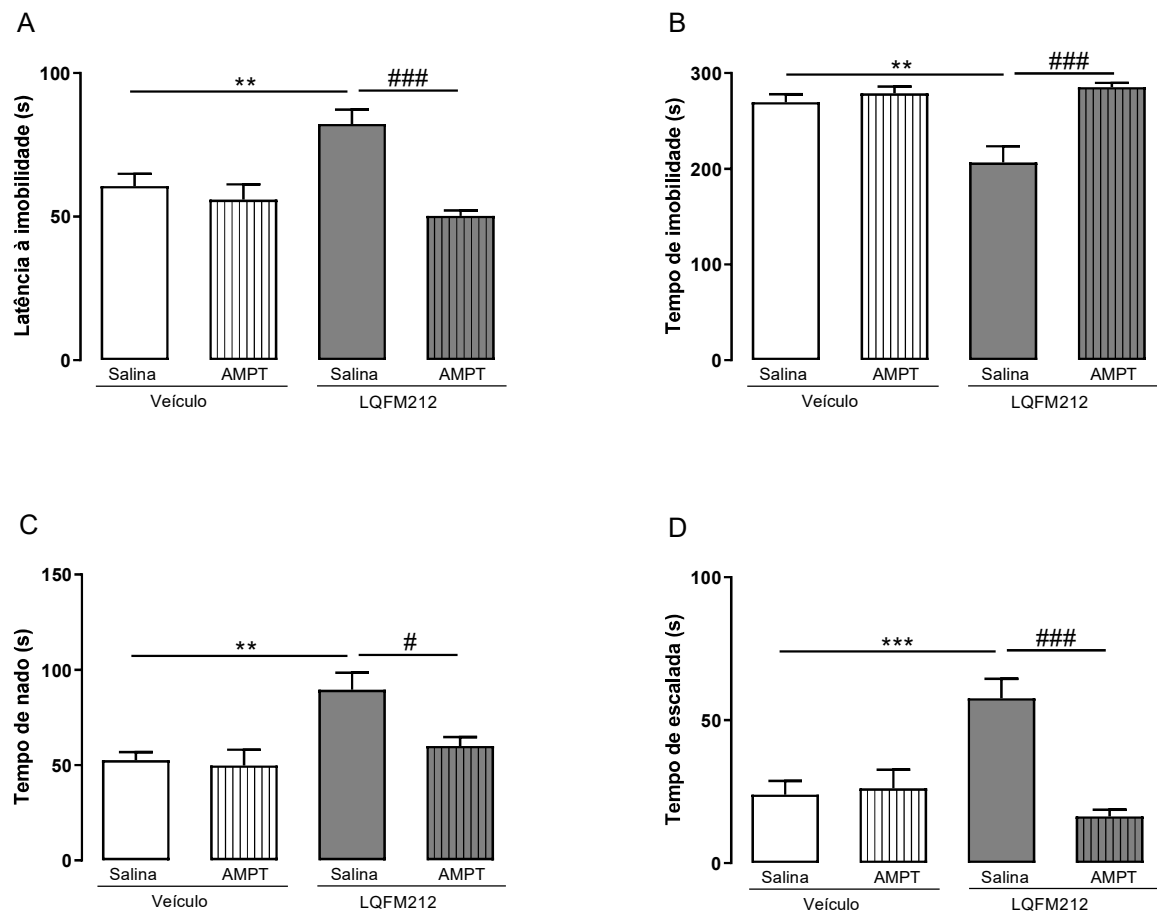


Figura 16. Efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do nado forçado após 1 hora de tratamento por via oral e reversão deste efeito na presença do inibidor da enzima tirosina hidroxilase, AMPT (512 $\mu\text{mol/kg}$). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=8$) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. ** $p<0,01$ e * $p<0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e # $p<0,05$ e ### $p<0,001$ – comparado com o grupo LQFM212 (salina 0,9% + LQFM212 54 $\mu\text{mol/kg}$) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. AMPT, *alfa*-metil-*p*-tirosina.**

4.1.3 Quantificação dos níveis hipocampais de BDNF

O tratamento em dose única de ambos os compostos, LQFM212 ou imipramina, não alterou os níveis hipocampais de BDNF (**Figura 17A**), quando comparado com o grupo tratado com veículo ($308,2 \pm 31,78$ pg/mg de proteína). Entretanto, o tratamento repetido com LQFM212 ou imipramina por 15 dias aumentou os níveis hipocampais de BDNF em 37% ($p < 0,05$) e 69% ($p < 0,01$), respectivamente (**Figura 17B**), quando comparado com o grupo tratado com veículo ($221,7 \pm 33,23$ pg/mg de proteína).

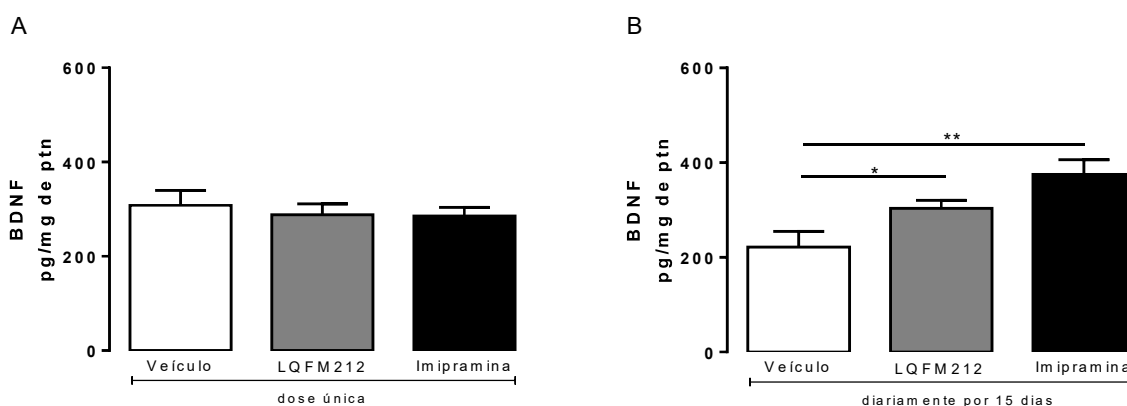


Figura 17. Níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo de camundongos tratados por via oral com veículo, LQFM212 (54 μ mol/kg) ou imipramina (54 μ mol/kg). (A) dose única - 1 hora após o tratamento, e (B) tratamento com doses repetidas por 15 dias - 1x ao dia. Imipramina (54 μ mol/kg) foi utilizada no teste como controle positivo. As barras verticais representam a média $\pm$ EPM (n=5). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ - comparado com o grupo tratado com veículo (10 mL/kg) usando o teste-*t*. ptn, proteína.

4.1.4 Avaliação de possíveis alterações indicativas de efeitos adversos

Todos os tratamentos por via oral durante 15 dias não alteram o peso corporal dos animais (**Figura 18**). Além disso, os níveis de GSH no fígado e os níveis séricos de AST, ALT, ureia e creatinina permaneceram inalterados quando comparados com os animais tratados com veículo (**Tabela 1**).

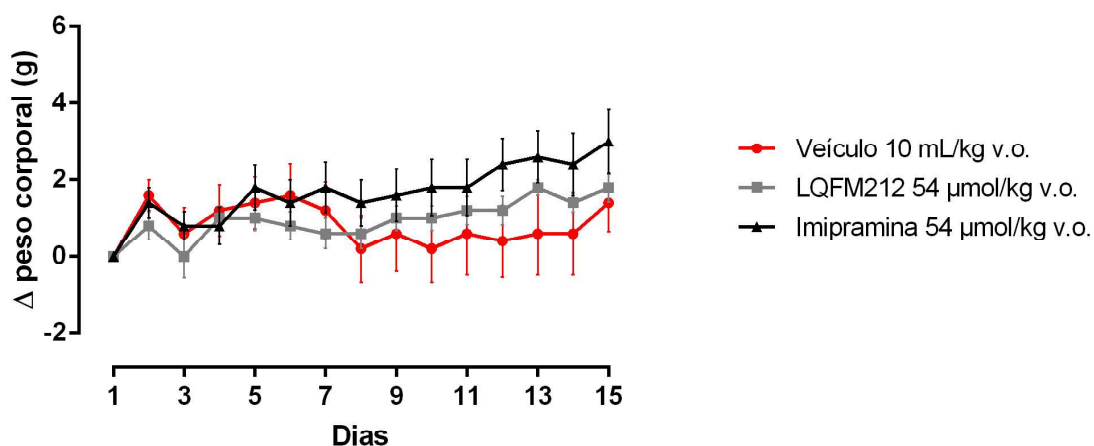


Figura 18. Efeito da administração oral com veículo, LQFM212 ou imipramina por 15 dias no peso corporal dos camundongos. As linhas e pontos representam a média $\pm$ EPM ($n=5$) das diferenças de peso de cada animal em relação ao peso do primeiro dia de tratamento. $p<0,05$ – comparado com o grupo tratado com veículo (10 mL/kg) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

Tabela 1. Efeito da administração oral com veículo, LQFM212 ou imipramina por 15 dias nos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais dos camundongos.

Parâmetros bioquímicos	Veículo Tween 80 2%	LQFM212 54 µmol/kg	Imipramina 54 µmol/kg
GSH (µmol/g de tecido)	11,46 ± 1,08	11,31 ± 1,01	10,71 ± 0,74
AST (U.I./L)	26,38 ± 4,15	31,21 ± 4,22	32,82 ± 5,43
ALT (U.I./L)	24,08 ± 2,73	21,48 ± 1,21	25,68 ± 2,63
Ureia (mmol/L)	8,06 ± 2,19	9,87 ± 1,33	10,77 ± 2,63
Creatinina (µmol/L)	70,35 ± 5,80	70,35 ± 10,05	87,07 ± 17,7

Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=5). $p < 0,05$ – comparado com o grupo tratado com veículo (10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GSH, glutationa.

4.2 Avaliação comportamental no modelo de neuroinflamação

4.2.1 Teste do campo aberto

O pré-tratamento por via intraperitoneal com salina 0,9% e tratamento por via oral com o composto LQFM212 (grupo salina/LQFM212) não alterou o número total de áreas invadidas no campo aberto (**Figura 19A**), quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo ($123,60 \pm 3,24$). Entretanto, aumentou a preferência pela área central do campo aberto, demonstrado pelo aumento da porcentagem de cruzamentos no centro em 15% [**Figura 19B** ($p < 0,01$)] e da porcentagem de tempo no centro em 47% [**Figura 19C** ($p < 0,001$)], quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo ($50,28 \pm 2,02\%$; $38,15 \pm 2,48\%$). O grupo controle positivo, tratado por via oral com salina/buspirona, apresentou efeitos semelhantes, uma vez que não alterou o número total de áreas invadidas (**Figura 19A**), e aumentou a porcentagem de cruzamentos no centro em 16% [**Figura 19B** ($p < 0,05$)] e a porcentagem de tempo no centro em 31% [**Figura 19C** ($p < 0,01$)], quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo.

O pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) não alterou o número total de áreas invadidas (**Figura 19A**), porém, reduziu a porcentagem de tempo no centro em 29% [**Figura 19C** ($p < 0,05$)] e a frequência de levantadas em 41% [**Figura 19D** ($p < 0,001$)], além disso, aumentou a frequência de autolimpeza em 116% [**Figura 19E** ($p < 0,01$)] e o tempo de imobilidade em 688% [**Figura 19F** ($p < 0,001$)], quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo ($123,60 \pm 3,24$; $38,15 \pm 2,48\%$; $63,33 \pm 2,63$; $2,67 \pm 0,74$; $2,79 \pm 0,77$ s). Entretanto, o tratamento com LQFM212 reverteu, pelo menos em parte, os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS [(**Figuras 19C, 19D e 19F**) LPS/veículo vs LPS/LQFM212], demonstrado pelo aumento da porcentagem de tempo no centro em 176% [**Figura 19C** ($p < 0,001$)], da frequência de levantadas em 31% [**Figura 19D** ($p < 0,05$)], e redução do tempo de imobilidade em 57% [**Figura 19F** ($p < 0,01$)], quando comparado ao grupo tratado com LPS/veículo ($27,24 \pm 1,43\%$; $37,11 \pm 3,24$; $21,99 \pm 4,65$ s). Em condições experimentais semelhantes, o controle positivo buspirona reduziu o número de áreas invadidas no campo aberto em 61% [**Figura 19A** ($p < 0,001$) LPS/veículo vs LPS/buspirona], quando comparado com o grupo tratado com

LPS/veículo ($108,80 \pm 4,97$). O tratamento com buspirona reverteu os efeitos do pré-tratamento com LPS em relação aos parâmetros de porcentagem de cruzamentos no centro em 21% [Figura 19B ($p < 0,01$)] e de porcentagem de tempo no centro em 155% [Figura 19C ($p < 0,001$)], quando comparado com o grupo tratado com LPS/veículo ($47,01 \pm 1,02\%$; $27,24 \pm 1,43\%$).

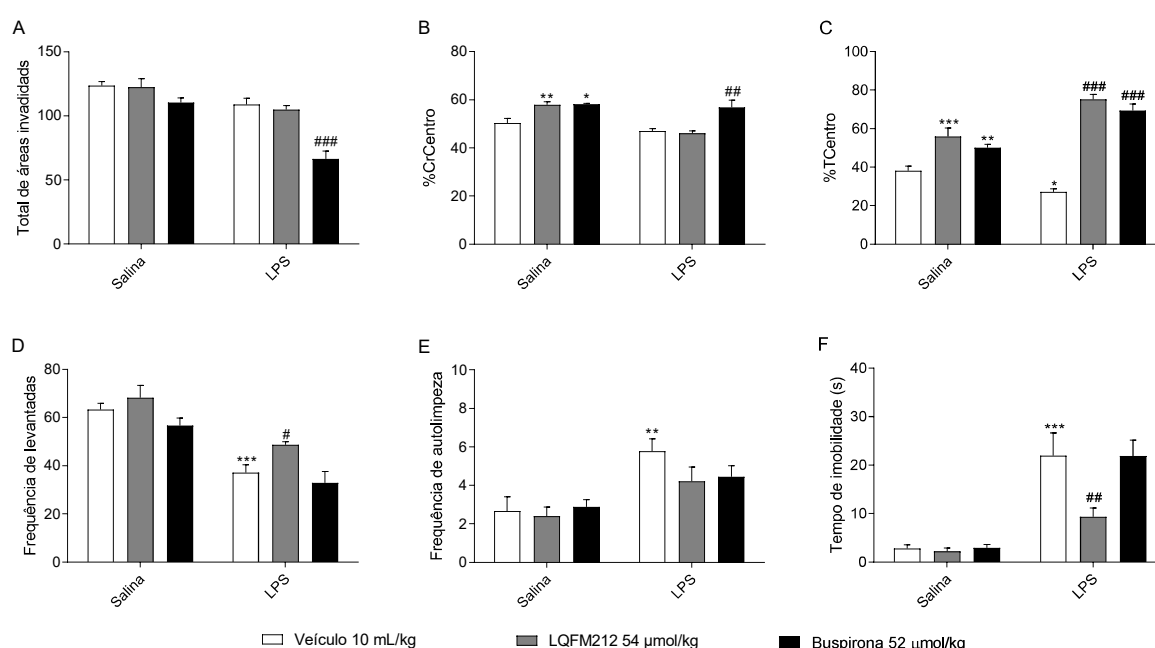


Figura 19. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) após a administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg) no teste do campo aberto. As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=9$) do (A) número total de áreas invadidas no campo aberto, (B) porcentagem de linhas cruzadas e de (C) tempo despendido na área central do campo aberto, (D) frequência de levantadas e de (E) autolimpeza e (F) tempo de imobilidade em segundos. Buspirona (52 µmol/kg) foi utilizada como controle positivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. LPS, lipopolissacarídeo.

4.2.2 Teste do nado forçado

O pré-tratamento por via intraperitoneal com salina 0,9% e tratamento por via oral com o composto LQFM212 (grupo salina/LQFM212) diminuiu o tempo de imobilidade em 27% [**Figura 20B** ($p<0,01$)] e aumentou a latência para imobilidade, tempo de nado e tempo de escalada em 28% ($p<0,01$), 46% ($p<0,001$) e 40% ($p<0,05$), respectivamente (**Figuras 20A, 20C e 20D**), quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo ($202 \pm 9,96$; $70,68 \pm 2,22$; $95,4 \pm 4,96$; $60,24 \pm 3,83$ s). O grupo controle positivo, tratado salina/buspirona, apresentou efeitos semelhantes uma vez que reduziu o tempo de imobilidade em 20% [**Figura 20B** ($p<0,05$)] e aumentou o a latência para imobilidade e o tempo de nado em 23% ($p<0,01$) e 42% ($p<0,01$), respectivamente (**Figuras 20A e 20C**), quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo.

O pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) aumentou o tempo de imobilidade em 22% [**Figura 20B** ($p<0,01$)] e reduziu a latência para imobilidade, tempo de nado e tempo de escalada em 23% ($p<0,05$), 39% ($p<0,01$) e 38% ($p<0,01$), respectivamente (**Figuras 20A, 20C e 20D**), quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo. Por outro lado, o tratamento com LQFM212 reverteu os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS [(**Figura 20**) LPS/veículo vs LPS/LQFM212], demonstrado pela redução do tempo de imobilidade em 33% [**Figura 20B** ($p<0,001$)] e aumento da latência para imobilidade, tempo de nado e tempo de escalada em 71% ($p<0,001$), 131% ($p<0,001$) e 71% ($p<0,01$), respectivamente (**Figuras 20A, 20C e 20D**), quando comparado ao grupo tratado com LPS/veículo ($246,70 \pm 6,06$; $54,25 \pm 2,69$; $58,16 \pm 3,98$; $37,37 \pm 5,16$ s). O controle positivo buspirona mostrou efeitos semelhantes [(**Figura 20**) LPS/veículo vs LPS/buspirona], pela redução do tempo de imobilidade em 28% [**Figura 20B** ($p<0,001$)] e aumento da latência para imobilidade, tempo de nado e tempo de escalada em 51% ($p<0,001$), 96% ($p<0,001$) e 61% ($p<0,01$), respectivamente (**Figuras 20A, 20C e 20D**), quando comparado ao grupo tratado com LPS/veículo.

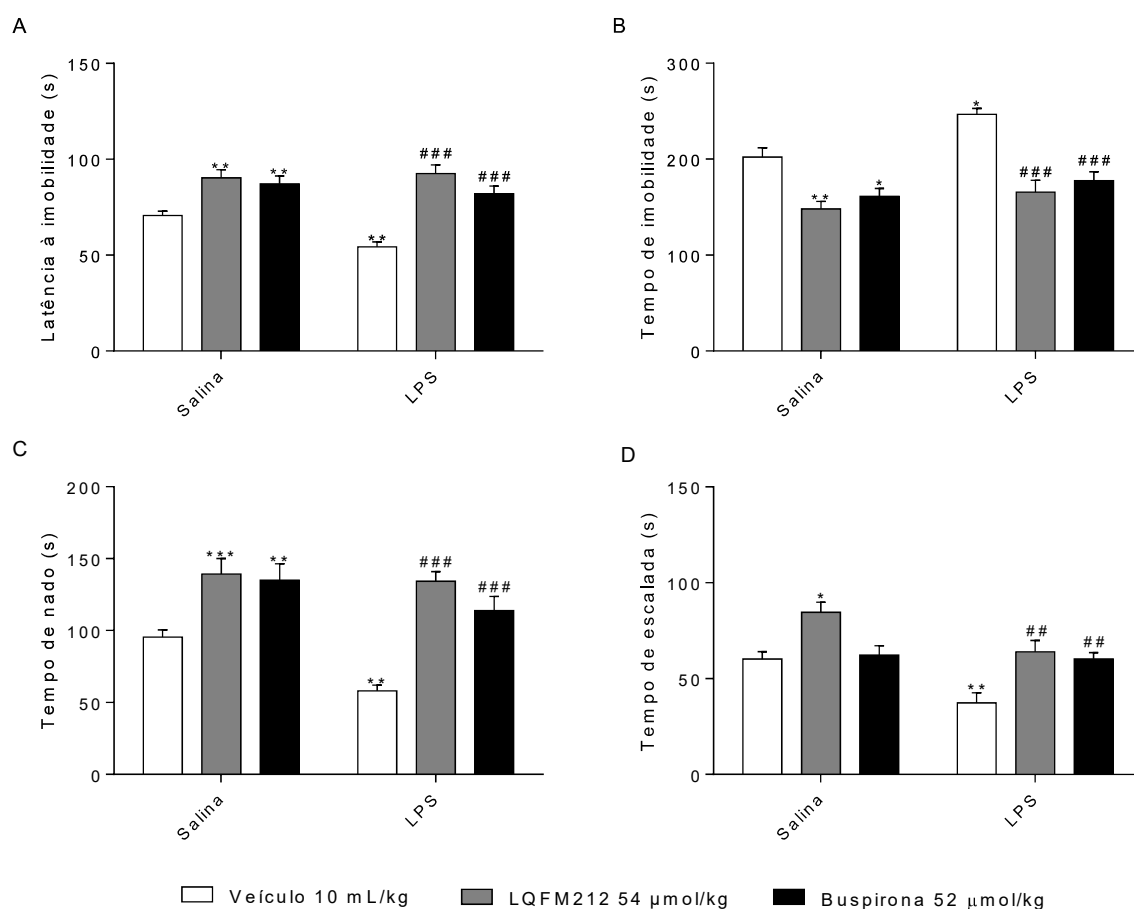


Figura 20. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) após a administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg) no teste do nado forçado. As barras verticais representam a média $\pm$ EPM (n=9) do (A) tempo de latência à imobilidade, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de nado e (D) tempo de escalada em segundos. Buspirona (52 µmol/kg) foi utilizada como controle positivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. LPS, lipopolissacarídeo.

4.2.3 Teste da suspensão pela cauda

O pré-tratamento por via intraperitoneal com salina 0,9% e tratamento por via oral com o composto LQFM212 (grupo salina/LQFM212) aumentou a latência para imobilidade 28% [**Figuras 21A** ($p < 0,01$)] e diminui o tempo de imobilidade em 28% [**Figura 21B** ($p < 0,001$)], quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo ($56,35 \pm 1,93$; $182,60 \pm 8,40$ s). O grupo controle positivo, tratado com salina/buspirona, apresentou efeitos semelhantes uma vez que aumentou a latência para imobilidade 23% [**Figuras 21A** ($p < 0,05$)] e diminui o tempo de imobilidade em 25% [**Figura 21B** ($p < 0,01$)], quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo.

O pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) reduziu a latência para imobilidade em 26% [**Figura 21A** ($p < 0,01$)] e aumentou o tempo de imobilidade em 18% [**Figura 21B** ($p < 0,05$)], quando comparado ao grupo tratado com salina/veículo. Por outro lado, o tratamento com LQFM212 reverteu os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS [(**Figura 21**) LPS/veículo vs LPS/LQFM212], demonstrado pelo aumento da latência para imobilidade 75% [**Figura 21A** ($p < 0,001$)] e redução do tempo de imobilidade em 35% [**Figura 21B** ($p < 0,001$)], quando comparado ao grupo tratado com LPS/veículo ($41,59 \pm 2,08$; $215,50 \pm 6,50$ s). Em condições experimentais semelhantes, o controle positivo buspirona reverteu, pelo menos em parte, o efeito o efeito causado pelo pré-tratamento com LPS [(**Figura 21**) LPS/veículo vs LPS/buspirona], demonstrado pelo aumento da latência para imobilidade em 32% [**Figura 21A** ($p < 0,05$)], quando comparado ao grupo tratado com LPS/veículo.

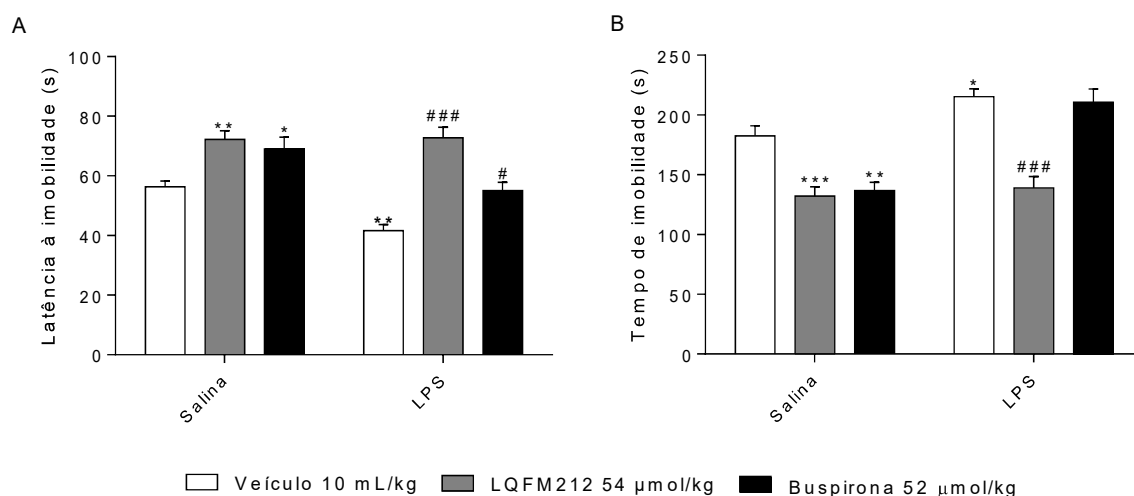


Figura 21. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) após a administração intraperitoneal de LPS (1 mg/kg) no teste de suspensão pela cauda. As barras verticais representam a média $\pm$ EPM (n=9) do (A) tempo de latência à imobilidade e do (B) tempo de imobilidade em segundos. Bupirone (52 µmol/kg) foi utilizada como controle positivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. LPS, lipopolissacarídeo.

4.3 Modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS

Tanto a administração intrapleurar de carragenina como de LPS, quando comparado ao grupo de animais que receberam administração de salina 0,9%, aumentaram o número de células migradas para o exsudato pleural dos animais submetidos ao modelo pleurisia (**Tabela 2**). A administração de carragenina aumentou o número total de leucócitos em 824% ($p<0,001$), e na contagem diferencial, mostrou um aumento do número de células polimorfonucleares em 453% [$p<0,001$; veículo/salina vs veículo/carragenina (**Tabela 2**)]. Com a administração de LPS, o número total de leucócitos aumentou 516% ($p<0,001$), e na contagem diferencial, observou-se um aumento de 650% no número de células polimorfonucleares ($p<0,001$) e de células mononucleares em 153% ($p<0,05$) [veículo/salina vs veículo/LPS (**Tabela 2**)]. Como mostra a **Tabela 2**, o tratamento por via oral com LQFM212 não reverteu nenhuma das alterações observadas na migração celular causada por carragenina (veículo/salina vs LQFM212/carragenina) ou LPS (veículo/salina vs LQFM212/LPS). Por outro lado, o tratamento com o controle positivo, dexametasona, diminuiu o número de leucócitos totais e de células polimorfonucleares em 76% e 88%, respectivamente [$p<0,001$; veículo/carragenina vs dexametasona/carragenina (**Tabela 2**)]. Efeitos semelhantes foram observados quando foi utilizado LPS, em que a dexametasona diminuiu o número de leucócitos totais e de células polimorfonucleares em 65% e 70%, respectivamente [$p<0,001$; veículo/LPS vs dexametasona/LPS (**Tabela 2**)].

Tabela 2. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) sobre a migração celular no exsudato pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS.

Migração celular no exsudato pleural	Salina 0,9%		Carragenina 1% ou LPS (250 ng/mL)		
	Veículo	10 mL/kg	Veículo	LQFM212	Dexametasona
	10 mL/kg		10 mL/kg	54 $\mu\text{mol/kg}$	5,1 $\mu\text{mol/kg}$
<i>Modelo de pleurisia induzido por carragenina</i>					
Leucócitos totais x $10^6/\text{mL}$	1,39 $\pm$ 0,30		12,75 $\pm$ 0,44***	12,03 $\pm$ 0,56	3,11 $\pm$ 0,64###
Células polimorfonucleares x $10^6/\text{mL}$	0,88 $\pm$ 0,10		4,87 $\pm$ 0,56***	4,66 $\pm$ 0,47	0,56 $\pm$ 0,18###
Células mononucleares x $10^6/\text{mL}$	1,38 $\pm$ 0,11		1,98 $\pm$ 0,31	1,93 $\pm$ 0,39	1,59 $\pm$ 0,18
<i>Modelo de pleurisia induzido por LPS</i>					
Leucócitos totais x $10^6/\text{mL}$	1,76 $\pm$ 0,26		10,85 $\pm$ 1,26***	10,62 $\pm$ 0,94	3,83 $\pm$ 0,77###
Células polimorfonucleares x $10^6/\text{mL}$	0,93 $\pm$ 0,19		6,98 $\pm$ 1,09***	6,88 $\pm$ 0,76	2,09 $\pm$ 0,35###
Células mononucleares x $10^6/\text{mL}$	0,83 $\pm$ 0,12		1,96 $\pm$ 0,36	2,30 $\pm$ 0,46	1,75 $\pm$ 0,48

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM do número de células (n=9). ***p<0,001 – comparado com o grupo controle (veículo 10 mL/kg + salina 0,9%) e ###p<0,001 – comparado com o grupo carragenina ou LPS [(veículo 10 mL/kg + carragenina 1% ou veículo 10 mL/kg + LPS (250 ng/mL)] usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Dexametasona (5,1 $\mu\text{mol/kg}$) foi utilizada como controle positivo. LPS, lipopolissacarídeo.

4.4 Avaliação bioquímica após os modelos de neuroinflamação ou pleurisia

4.4.1 Dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias

O pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) aumentou a concentração das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e reduziu a concentração de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no soro dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS [(Figura 22) salina/veículo vs LPS/veículo]. Dessa forma, aumentou a concentração de TNF- α em 23% [Figura 22A ($p < 0,001$)] e de IL-1 β em 66% [Figura 22B ($p < 0,001$)], e reduziu a concentração de IL-4 em 60% [Figura 22C ($p < 0,001$)] e de IL-10 em 9% [Figura 22D ($p < 0,05$)], quando comparado ao grupo salina/veículo ($70,88 \pm 2,12$; $12,37 \pm 1,55$; $26,22 \pm 2,40$; $990,3 \pm 11,30$ pg/mL). Por outro lado, o tratamento por via oral com LQFM212 reverteu os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS [(Figura 22) LPS/veículo vs LPS/LQFM212], demonstrado pela redução de TNF- α em 18% [Figura 22A ($p < 0,001$)] e de IL-1 β em 57% [Figura 22B ($p < 0,001$)], e aumento de IL-4 em 124% [Figura 22C ($p < 0,001$)] e de IL-10 em 11% [Figura 22D ($p < 0,05$)], quando comparado ao grupo LPS/veículo ($87,33 \pm 2,75$; $20,5 \pm 1,30$; $10,58 \pm 1,50$; $901,60 \pm 24,22$ pg/mL). O controle positivo, bupiriona, mostrou efeitos semelhantes [(Figura 22) LPS/veículo vs LPS/bupiriona], uma vez que reduziu os níveis de TNF- α em 10% [Figura 22A ($p < 0,05$)] e de IL-1 β em 25% [Figura 22B ($p < 0,05$)], e aumento de IL-4 em 82% [Figura 22C ($p < 0,01$)], mas não alterou os níveis de IL-10 (Figura 22D), quando comparado ao grupo LPS/veículo.

No modelo de pleurisia, quando a carragenina foi utilizada, os níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β foram aumentados no exsudado pleural em 430% e 1085%, respectivamente [$p < 0,001$; veículo/salina vs veículo/carragenina (Tabela 3)]. No mesmo modelo, porém utilizando LPS, houve um aumento no exsudado pleural de TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-10 em 132% ($p < 0,001$), 460% ($p < 0,001$), 14% ($p < 0,05$) e 72% ($p < 0,05$), respectivamente [veículo/salina vs veículo/LPS (Tabela 3)]. Como mostra a Tabela 3, o tratamento por via oral com LQFM212 não modificou nenhuma das alterações no exsudado pleural causadas por carragenina (veículo/carragenina vs LQFM212/carragenina) ou LPS (veículo/LPS vs LQFM212/LPS), contudo, o tratamento com o controle positivo, dexametasona, diminuiu os níveis de TNF- α e IL-

1 β , e aumentou os níveis de IL-4 e IL-10, tanto na presença de carragenina (veículo/carragenina vs LQFM212/carragenina) como de LPS (veículo/LPS vs LQFM212/LPS).

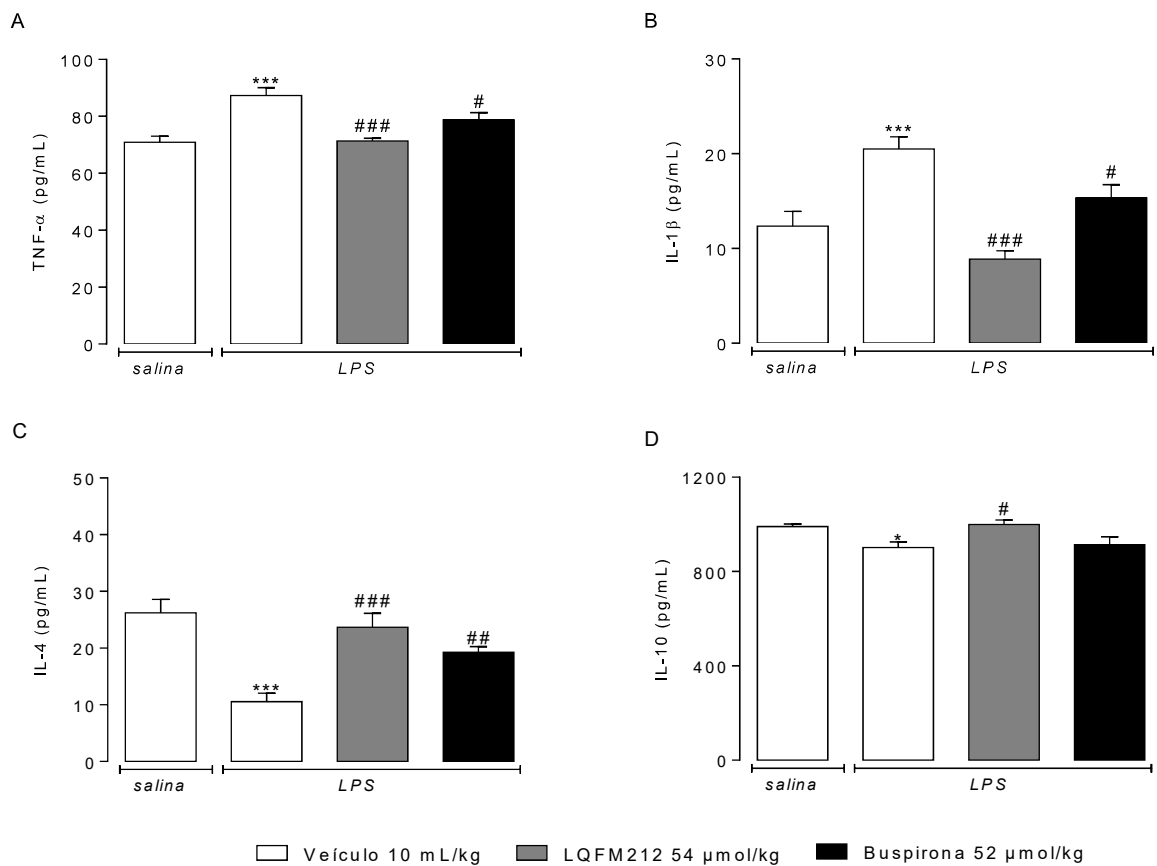


Figura 22. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 μ mol/kg) sobre os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no soro de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM (n=6). Buspirona (52 μ mol/kg) foi utilizada como controle positivo. *p<0,05 e ***p<0,001 – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg), e #p<0,01 e ##p<0,01 e ###p<0,001 – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-4, interleucina 4; IL-10, interleucina 10; LPS, lipopolissacarídeo; TNF- α , fator de necrose tumoral α .

Tabela 3. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) sobre os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias no exsudato pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina ou LPS.

Citocinas no exsudato pleural (pg/mL)	Salina 0,9%		Carragenina 1% ou LPS (250 ng/mL)		
	Veículo 10 mL/kg		Veículo 10 mL/kg	LQFM212 54 $\mu\text{mol/kg}$	Dexametasona 5,1 $\mu\text{mol/kg}$
<i>Modelo de pleurisia induzido por carragenina</i>					
TNF- α	28,98 $\pm$ 5,84		153,30 $\pm$ 6,50***	161,10 $\pm$ 18,80	17,50 $\pm$ 4,46###
IL-1 β	75,30 $\pm$ 0,81		892,70 $\pm$ 9,80***	870,20 $\pm$ 18,79	187,10 $\pm$ 8,52###
IL-4	21,30 $\pm$ 0,73		24,01 $\pm$ 1,05	23,32 $\pm$ 1,64	29,95 $\pm$ 0,74##
IL-10	52,33 $\pm$ 6,86		34,50 $\pm$ 7,07	46,00 $\pm$ 8,73	176,00 $\pm$ 5,17###
<i>Modelo de pleurisia induzido por LPS</i>					
TNF- α	15,65 $\pm$ 2,16		36,30 $\pm$ 2,78***	38,52 $\pm$ 3,62	15,59 $\pm$ 2,75###
IL-1 β	9,97 $\pm$ 1,33		55,82 $\pm$ 4,12***	84,50 $\pm$ 4,75	15,98 $\pm$ 1,75###
IL-4	17,04 $\pm$ 1,06		19,34 $\pm$ 0,80*	20,95 $\pm$ 0,62	24,25 $\pm$ 0,40###
IL-10	17,48 $\pm$ 2,84		30,11 $\pm$ 3,82*	30,01 $\pm$ 3,36	45,27 $\pm$ 1,26##

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (n=6). Dexametasona (5,1 $\mu\text{mol/kg}$) foi utilizada como controle positivo. *p<0,05 e ***p<0,001 – comparado com o grupo controle (veículo 10 mL/kg + salina 0,9%); ###p<0,01 e ####p<0,001 – comparado com o grupo carragenina ou LPS [(veículo 10 mL/kg + carragenina 1% ou veículo 10 mL/kg + LPS (250 ng/mL)] usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. LPS, lipopolissacarídeo.

4.4.2 Atividade da enzima MPO

No modelo de pleurisia, a administração de carragenina ou LPS aumentou a atividade da MPO no exsudato pleural em 449% [$p < 0,001$; veículo/salina vs veículo/carragenina (**Figura 23A**)] e 135% [$p < 0,001$; veículo/salina vs veículo/LPS (**Figura 23B**)], quando comparado aos animais do grupo que recebeu administração de salina ($22,03 \pm 5,89$; $43,20 \pm 4,59$ mU/mL). O tratamento por via oral com LQFM212 diminuiu a atividade da MPO no exsudato pleural em 24% [$p < 0,01$; veículo/carragenina vs LQFM212/carragenina (**Figura 23A**)] e 58% [$p < 0,01$; veículo/LPS vs LQFM212/LPS (**Figura 23B**)]. O controle positivo, dexametasona, mostrou efeitos semelhantes, reduzindo a atividade da MPO no exsudato pleural em 54% [$p < 0,001$; veículo/carragenina vs dexametasona/carragenina (**Figura 23A**)] e 59% [$p < 0,001$; veículo/LPS vs dexametasona/LPS (**Figura 23B**)].

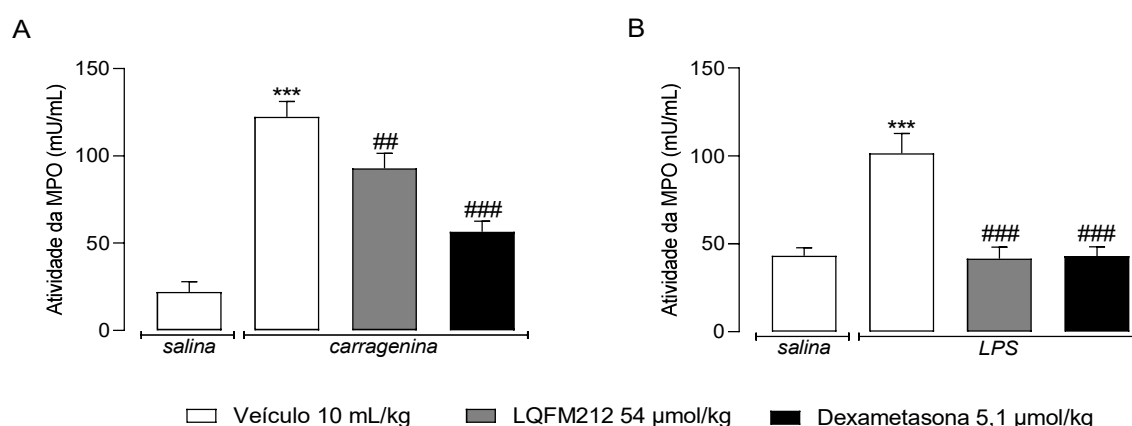


Figura 23. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no exsudato pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina 1% ou LPS (250 ng/mL). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM ($n=6$). Dexametasona (5,1 µmol/kg) foi utilizada como controle positivo. *** $p < 0,001$ – comparado com o grupo controle (veículo 10 mL/kg + salina 0,9%); ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ – comparado com o grupo carragenina ou LPS [(veículo 10 mL/kg + carragenina 1% ou veículo 10 mL/kg + LPS (250 ng/mL)] usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. LPS, lipopolissacarídeo; MPO, mieloperoxidase.

Ademais, o pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) aumentou a atividade da MPO nas amostras cerebrais dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS [(Figura 24) salina/veículo vs LPS/veículo], em que foi aumentada no córtex pré-frontal em 21% [Figura 24A ($p < 0,01$)] e no hipocampo em 37% [Figura 24B ($p < 0,001$)], quando comparado ao grupo salina/veículo ($88,81 \pm 3,99$; $67,72 \pm 4,05$ mU/mL). O tratamento por via oral com LQFM212 (salina/veículo vs salina/LQFM212) ou com buspirona (salina/veículo vs salina/buspirona) *per se* não alterou a atividade da mieloperoxidase nestas áreas cerebrais (Figura 24). Entretanto, o tratamento com LQFM212 reverteu os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS (LPS/veículo vs LPS/LQFM212), demonstrado pela diminuição da atividade da MPO em ambas as áreas em 24% [Figura 24A ($p < 0,001$)] e 36% [Figura 24B ($p < 0,001$)], respectivamente, quando comparado ao grupo LPS/veículo ($107,7 \pm 2,53$; $92,69 \pm 2,52$ mU/mL). Já o tratamento com o controle positivo, buspirona, reduziu a atividade da MPO somente no córtex pré-frontal em 20% [$p < 0,001$; LPS/veículo vs LPS/buspirona (Figura 24A)] quando comparado ao grupo LPS/veículo.

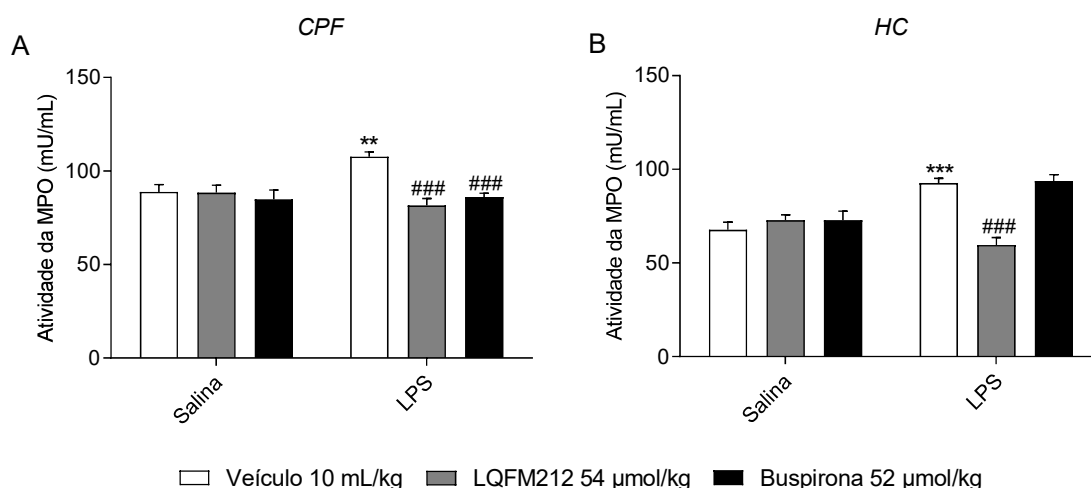


Figura 24. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no córtex pré-frontal ou hipocampo de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=6$) da atividade da mieloperoxidase no (A) córtex pré-frontal ou no (B) hipocampo. Buspirona (52

$\mu\text{mol/kg}$) foi utilizada como controle positivo. $**p<0,01$ e $***p<0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg); $####p<0,001$ – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. CPF, córtex pré-frontal; HC, hipocampo; LPS, lipopolissacarídeo; MPO, mieloperoxidase.

4.4.3 Níveis de nitritos

O pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) aumentou os níveis de nitritos nas amostras cerebrais dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS [(**Figura 25**) salina/veículo vs LPS/veículo], em que foram aumentados no córtex pré-frontal em 100% [**Figura 25A** ($p<0,01$)] e no hipocampo em 157% [**Figura 25B** ($p<0,01$)], quando comparado ao grupo salina/veículo ($2,88 \pm 0,48$; $0,96 \pm 0,27 \mu\text{M/g}$ de tecido). O tratamento por via oral com LQFM212 (salina/veículo vs salina/LQFM212) ou com buspirona (salina/veículo vs salina/buspirona) *per se* não alterou os níveis de nitritos nestas áreas cerebrais (**Figura 25**). Entretanto, o tratamento com LQFM212 reverteu os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS (LPS/veículo vs LPS/LQFM212), demonstrado pela diminuição dos níveis de nitritos em ambas as áreas em 58% [**Figura 25A** ($p<0,001$)] e 57% [**Figura 25B** ($p<0,001$)], respectivamente, quando comparado ao grupo LPS/veículo ($5,76 \pm 0,80$; $2,47 \pm 0,25 \mu\text{M/g}$ de tecido). Já o tratamento com o controle positivo, buspirona, reduziu os níveis de nitritos somente no córtex pré-frontal em 59% [$p<0,001$; LPS/veículo vs LPS/buspirona (**Figura 25A**)] quando comparado ao grupo LPS/veículo.

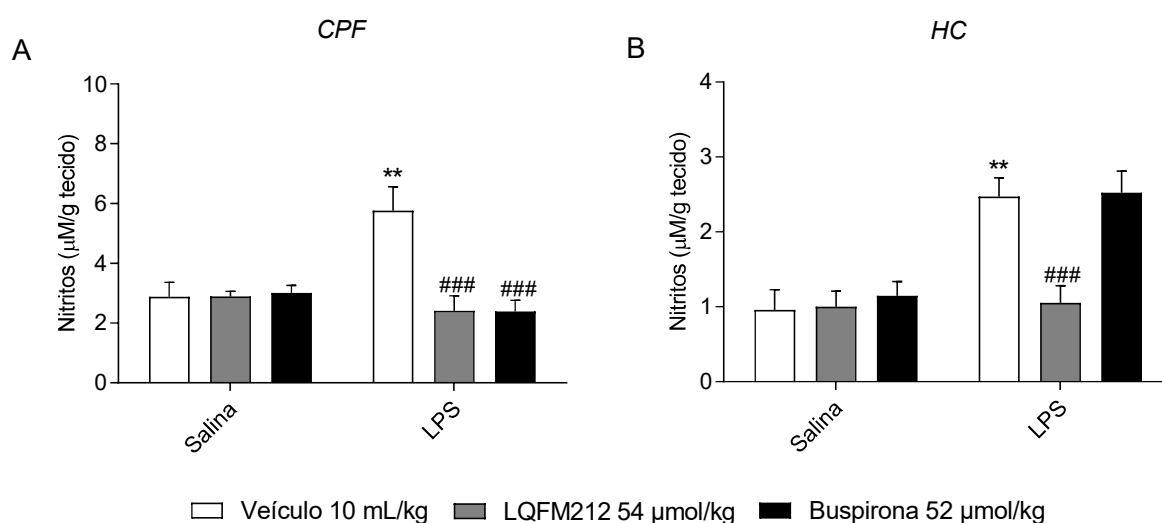


Figura 25. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) sobre os níveis de nitritos no córtex pré-frontal ou hipocampo de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=6$) dos níveis de nitritos no (A) córtex pré-frontal ou no (B) hipocampo. Bupirone (52 µmol/kg) foi utilizada como controle positivo. ** $p<0,01$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg); ### $p<0,001$ – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. CPF, córtex pré-frontal; HC, hipocampo; LPS, lipopolissacarídeo.

4.4.4 Níveis de GSH

O pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) reduziu os níveis de glutathiona nas amostras cerebrais dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS [(Figura 26) salina/veículo vs LPS/veículo], em que foram reduzidos no córtex pré-frontal em 14% [Figura 26A ($p<0,01$)] e no hipocampo em 10% [Figura 26B ($p<0,05$)], quando comparado ao grupo salina/veículo ($104,90 \pm 2,55$; $70,87 \pm 1,80$ µg/g de tecido). O tratamento por via oral com LQFM212 *per se* aumentou os níveis de GSH no córtex pré-frontal em 22% [Figura 26A ($p<0,001$)] e no hipocampo em 16% [Figura 26B

($p < 0,01$)] (salina/veículo vs salina/LQFM212), diferentemente, o tratamento por via oral com buspirona *per se* não alterou os níveis de glutathiona nestas áreas cerebrais [salina/veículo vs salina/buspirona (**Figura 26**)]. Ademais, o tratamento com LQFM212 reverteu os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS (LPS/veículo vs LPS/LQFM212), demonstrado pelo aumento dos níveis de glutathiona em ambas as áreas em 24% [**Figura 26A** ($p < 0,001$)] e 34% [**Figura 26B** ($p < 0,001$)], respectivamente, quando comparado ao grupo LPS/veículo ($90,04 \pm 1,73$; $64,14 \pm 1,25$ $\mu\text{g/g}$ de tecido). Já o tratamento com o controle positivo, buspirona, aumentou os níveis de GSH somente no córtex pré-frontal em 14% [$p < 0,05$; LPS/veículo vs LPS/buspirona (**Figura 26A**)] quando comparado ao grupo LPS/veículo.

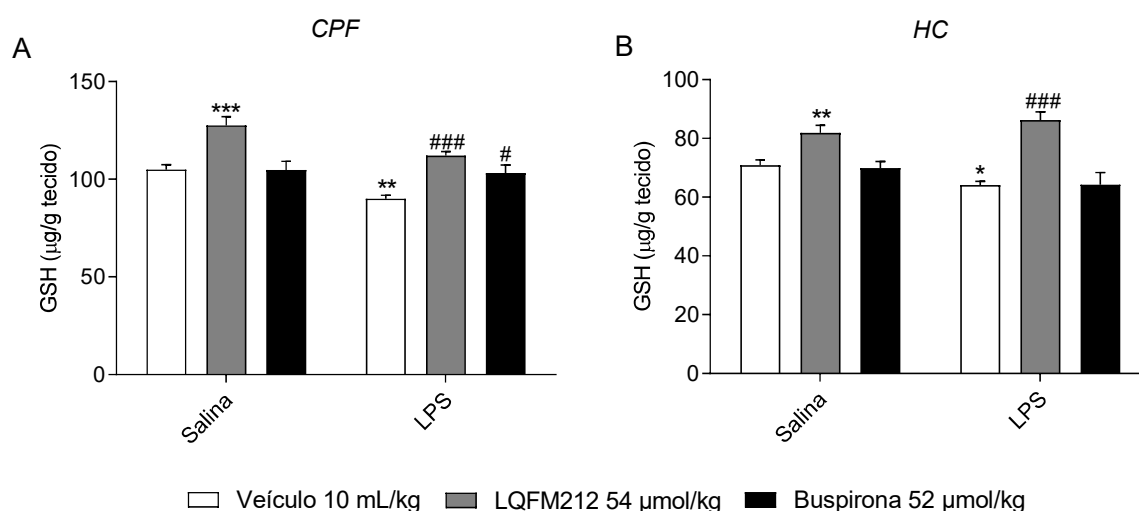


Figura 26. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 $\mu\text{mol/kg}$) sobre os níveis glutathiona no córtex pré-frontal ou hipocampo de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=6$) dos níveis de glutathiona no (A) córtex pré-frontal ou no (B) hipocampo. Buspirona (52 $\mu\text{mol/kg}$) foi utilizada como controle positivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg); # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. CPF, córtex pré-frontal; HC, hipocampo; LPS, lipopolissacarídeo.

4.4.5 Atividade da enzima ChE

O pré-tratamento por via intraperitoneal com LPS e tratamento oral com veículo (grupo LPS/veículo) aumentou a atividade da enzima colinesterase no cérebro dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS em 47% [$p < 0,01$; salina/veículo vs LPS/veículo (**Figura 27**)], quando comparado ao grupo salina/veículo ($2,62 \pm 0,09$ densidade óptica/mg de proteína). O tratamento por via oral com LQFM212 (salina/veículo vs salina/LQFM212) ou com buspirona (salina/veículo vs salina/buspirona) *per se* não alterou a atividade da ChE no cérebro total (**Figura 27**). Entretanto, o tratamento com LQFM212 ou buspirona reverteu os efeitos causados pelo pré-tratamento com LPS, demonstrados pela diminuição da atividade da colinesterase em amostras de cérebro total em 20% [$p < 0,01$] LPS/veículo vs LPS/LQFM212] e 14% [$p < 0,05$] LPS/veículo vs LPS/buspirona], respectivamente, quando comparado ao grupo LPS/veículo [$3,84 \pm 0,23$ densidade óptica/mg de proteína (**Figura 27**)].

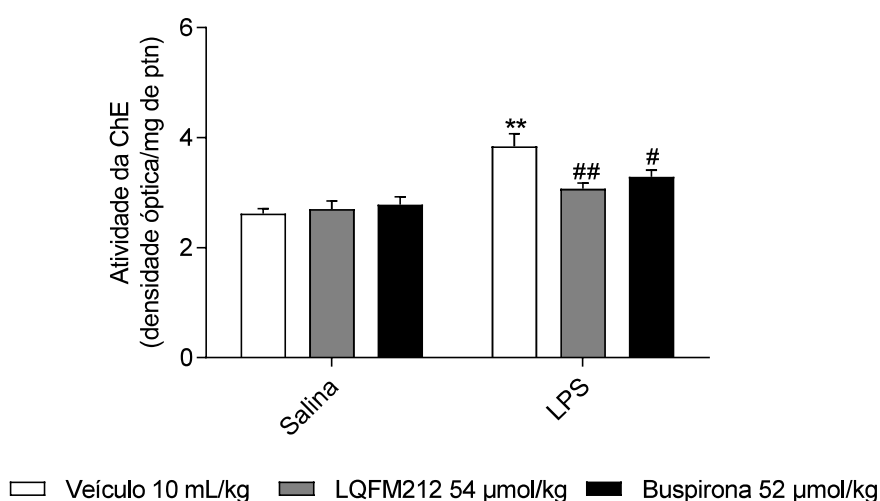


Figura 27. Efeito do tratamento por via oral com o composto LQFM212 (54 µmol/kg) sobre a atividade da colinesterase no cérebro de animais submetidos ao modelo de neuroinflamação induzida por LPS (1 mg/kg). As barras verticais representam a média $\pm$ EPM ($n=3$). Buspirona (52 µmol/kg) foi utilizada como controle positivo. ** $p < 0,01$ – comparado com o grupo controle (salina 0,9% + veículo 10 mL/kg); # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ – comparado com o grupo LPS (LPS 1 mg/kg + veículo 10 mL/kg) usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ChE, colinesterase; LPS, lipopolissacarídeo; ptn, proteína.

5 DISCUSSÃO

O composto LQFM212 é um derivado piperazínico, e parte das atividades deste composto foi anteriormente caracterizada como uma atividade tipo-ansiolítica envolvendo vias serotoninérgicas, nicotínicas e GABAérgicas, sem causar prejuízos cognitivos (Moreira et al., 2020). Estudos tem mostrado que outros derivados piperazínicos também apresentam efeitos neurofarmacológicos (Neves et al., 2013; Galdino et al., 2015a; Brito et al., 2017), e que podem ser úteis em mais de um transtorno mental, por exemplo, a buspirona, útil no tratamento de transtornos ansiosos e depressivos (Celada et al., 2013). A descoberta de fármacos que possam ser usados em ambas as doenças mentais é de grande importância, uma vez que ansiedade e depressão podem ocorrer independentemente ou coexistirem. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível atividade tipo-antidepressiva do composto LQFM212 e investigar os mecanismos subjacentes aos efeitos encontrados. Também foi investigado a possibilidade de efeitos adversos após o tratamento com doses repetidas por 15 dias.

A atividade tipo-antidepressiva do composto LQFM212 foi avaliada em camundongos usando o teste do nado forçado após administração por via oral com dose única ou tratamento com doses repetidas. Este teste geralmente é sensível a uma gama de fármacos antidepressivos, e consequentemente, possui alta validade preditiva e pode ser usado para avaliar os efeitos de várias manipulações comportamentais e neurobiológicas em pesquisas básicas e pré-clínicas para triagem de novos compostos (Can et al., 2012; Yankelevitch-Yahav et al., 2015). O teste NF se baseia na hipótese de que ao colocar o animal em um recipiente cheio de água, ele primeiro fará esforços para escapar, mas eventualmente exibirá imobilidade que pode ser considerada como um reflexo de uma medida de desespero comportamental (Yankelevitch-Yahav et al., 2015).

Embora o comportamento de imobilidade seja o parâmetro mais discutido no teste NF, os comportamentos ativos - tempo de nado e tempo de escalada - também possuem valor significativo e podem ajudar a diferenciar os mecanismos neuroquímicos subjacentes aos comportamentos no teste NF, bem como aumentar a sensibilidade do teste (Porsolt, 1978; Can et al., 2012; Pesarico et al., 2014; Chen et al., 2015; Yankelevitch-Yahav et al., 2015). Os antidepressivos que aumentam a

neurotransmissão serotoninérgica são relatados que aumentam o tempo de nado, enquanto aqueles que aumentam a neurotransmissão catecolaminérgica aumentam o tempo de escalada (Detke; Lucki, 1995). Embora estes efeitos sejam predominantemente estabelecidos em experimentos com ratos, os resultados que foram encontrados ao investigar o mecanismo de ação do composto LQFM212 em camundongos parecem seguir na mesma direção, já que ambos os comportamentos ativos foram alterados e os resultados sobre o mecanismo de ação indicam que as vias monoaminérgicas, direta e/ou indiretamente, podem estar envolvidas na atividade tipo-antidepressiva de LQFM212. Resultados similares foram obtidos em camundongos por Galdino et al. (2015b) ao avaliar os efeitos do extrato de *Lafoensia pacari* no teste do nado forçado.

Ademais, a fim de evitar resultados errôneos, é importante relacionar os resultados encontrados no teste NF com outros testes comportamentais, especificamente aqueles que avaliam a atividade exploratória e locomotora, como o teste de campo aberto. Anteriormente, nosso grupo avaliou três doses de LQFM212 (18, 54 ou 162 $\mu\text{mol/kg}$) no teste do campo aberto, sendo escolhida a dose de 54 $\mu\text{mol/kg}$ para dar continuidade ao estudo do possível efeito tipo-antidepressivo, uma vez que esta dose não alterou o movimento espontâneo dos camundongos (Moreira et al., 2020), tornando os resultados encontrados no teste NF mais consistentes. O tratamento por via oral com o composto LQFM212 na dose de 54 $\mu\text{mol/kg}$ em ambos os protocolos de tratamento, dose única ou doses repetidas, reduziu o parâmetro de tempo de imobilidade e aumentou o tempo de latência à imobilidade, tempo de nado e tempo de escalada no teste NF, assim como o controle positivo imipramina. Estes resultados sugerem que LQFM212 possui efeito tipo-antidepressivo, além do efeito tipo-ansiolítico demonstrado por Moreira et al. (2020). O composto LQFM180, outro derivado piperazínico, também mostrou atividade tipo-antidepressiva na mesma faixa de dose que a atividade tipo-ansiolítica (Brito et al., 2018).

Dados da literatura sugerem um papel para a serotonina nos distúrbios de humor e no seu tratamento farmacológico. Os ISRS são úteis como tratamento de primeira linha, e acredita-se que estes fármacos exercem sua ação terapêutica aumentando os níveis de 5-HT ao bloquear o SERT (Santarsieri; Schwartz, 2015; Yohn et al., 2017). Os neurônios serotoninérgicos estão localizados principalmente no núcleo dorsal e mediano da rafe do tronco encefálico (Barnes; Sharp, 1999). Os efeitos neuromoduladores da serotonina são mediados por 14 subtipos de receptores que

são agrupados em subfamílias com base em seu mecanismo de sinalização primário. Evidências de estudos em humanos e roedores sugerem que o receptor de 5-HT_{1A} pode desempenhar um papel particularmente importante na etiologia de transtornos depressivos e no seu tratamento (Garcia-Garcia et al., 2014). O pré-tratamento com o antagonista WAY-100635 reverteu os efeitos do composto LQFM212 no teste do nado forçado, sugerindo que o efeito tipo-antidepressivo depende, pelo menos em parte, da ativação direta dos receptores de 5-HT_{1A}. Estes resultados corroboram com resultados anteriores, nos quais Moreira et al. (2020) mostrou que o antagonista WAY-100635 também reverte o efeito tipo-ansiolítico do composto LQFM212, e os resultados dos ensaios de docagem molecular mostraram que o composto possui afinidade com o receptor 5-HT_{1A}.

Na expectativa de avaliar indiretamente o sistema serotoninérgico, os animais receberam pré-tratamento com PCPA por 4 dias, o que leva a uma depleção de serotonina em torno de 60% a 80% devido à inibição da enzima triptofano hidroxilase (Redrobe et al., 1998; O'Leary et al., 2017). Os resultados mostraram que a administração prévia de PCPA reduziu os efeitos do composto LQFM212 no teste do nado forçado, sugerindo que direta e/ou indiretamente a via serotoninérgica é importante para o efeito tipo-antidepressivo desse composto, como mostrado anteriormente para o efeito tipo-ansiolítico (Moreira et al., 2020). Com os resultados da administração prévia de PCPA não é possível descrever exatamente em qual estágio da neurotransmissão serotoninérgica LQFM212 poderia atuar, entretanto, podemos especular que o mecanismo de ação de LQFM212 envolvendo a via serotoninérgica possa ser amplo, semelhante a outros derivados piperazínicos, como a vilazodona e a vortioxetina, que demonstraram ser importantes para um melhor e mais rápido efeito farmacológico pela atividade agonista em receptores 5-HT_{1A} e inibição do SERT (Sanchez et al., 2015; Sahli et al., 2016).

Apesar do fato de que a maioria dos fármacos disponíveis para tratar os transtornos depressivos visam o sistema serotoninérgico, sabe-se que as outras monoaminas NE e DA, também chamadas de catecolaminas, desempenham um papel notável nestes transtornos e em outras doenças relacionadas ao SNC (Blier; Mansari, 2013). Neste sentido, é demonstrado que a depressão também parece estar associada a uma hipofunção do sistema noradrenérgico, e alguns antidepressivos agem aumentando a disponibilidade da NE na fenda sináptica, como os ADT e IRSN, por exemplo, imipramina e velanfaxina, respectivamente (Nutt et al., 2006). Os

receptores noradrenérgicos são encontrados nas fibras nervosas que se originam do *locus coeruleus* e se projetam para outras partes do cérebro, incluindo o córtex, cerebelo, amígdala, hipocampo, gânglios basais, núcleos da rafe, tálamo e hipotálamo. Geralmente, os receptores α_1 - e β -adrenérgicos levam a efeito estimulante na sinalização celular, enquanto α_2 - tem uma influência inibitória (Chamberlain; Robbins, 2013).

Os resultados envolvendo os receptores noradrenérgicos mostraram que o efeito de LQFM212 no teste do nado forçado foi revertido, pelo menos em parte, na presença do antagonista prazosina, mas não com o antagonista propranolol, dessa forma, sugerindo que a ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos pode estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo do composto LQFM212, mas não parece envolver os receptores β -adrenérgicos. Achados clínicos mostram uma resposta reduzida de receptores α_1 -adrenérgicos cerebrais na depressão. Evidências comportamentais e neurofarmacológicas apontam um subgrupo de receptores α_{1B} -adrenérgicos cerebrais como fator para atividades comportamentais positivamente motivadas. Além disso, foi demonstrado que a ativação de receptores α_1 -adrenérgicos estimula a fosforilação de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase; MAPK) em regiões corticais, sendo esta via envolvida em processos de sinalização de fatores de crescimento (Williams et al., 1998; Stone et al., 2003).

O sistema dopaminérgico está envolvido na regulação do humor e no sistema de recompensa, e estudos de neuroimagem mostram que os transtornos depressivos pode estar associado a uma redução na neurotransmissão dopaminérgica (Dailly et al., 2004). Uma redução na atividade da dopamina no circuito mesocortical é sugerido que desempenhe um papel crítico na expressão da anedonia, um sintoma central da depressão em humanos (Belujon; Grace, 2017). Ademais, evidências farmacológicas demonstram a eficácia de fármacos antidepressivos sobre este sistema, por exemplo, a bupropiona que age inibindo preferencialmente a recaptação de DA, e consequentemente leva a um aumento deste neurotransmissor na fenda sináptica e restauração da neurotransmissão dopaminérgica (Hillhouse; Porter, 2015).

Os resultados envolvendo os receptores dopaminérgicos mostraram que ambos pré-tratamento com SCH-23390 ou sulpirida reverteram os efeitos do composto LQFM212 no teste do nado forçado, sugerindo que a ativação dos receptores dopaminérgicos D_1 e $D_{2/3}$ também contribuem para os efeito tipo-antidepressivo encontrado com LQFM212. Os receptores D_1 desempenham um papel

importante na regulação do sistema de recompensa, atividade locomotora, aprendizagem e memória, produção de AMPc e modulação da liberação de neurotransmissores por exocitose, e aumento da neurogênese hipocampal (Mishra et al., 2018). Além disso, o pramipexol, um agonista dos receptores $D_{2/3}$, foi proposto para pacientes resistentes ao tratamento para o TDM (Cusin et al., 2013; Fawcett et al., 2016; Tundo et al., 2022). Já o aripiprazol, um derivado piperazínico, mostra um efeito antidepressivo em ratos, que parece envolver a ativação dos receptores $5-HT_{1A}$, D_1 e D_2 (Takahashi et al., 2018).

As redes corticais, por exemplo, no córtex pré-frontal (CPF), podem controlar a neuroplasticidade sináptica e, conseqüentemente, modular a atividade neuronal associada a processos cognitivos (Van den Oever et al., 2010). Estes processos são conhecidos por estarem sob o controle de vários neurotransmissores, como a serotonina e a dopamina. Ambas as vias DA e 5-HT coexistem no CPF, e receptores serotoninérgicos como o $5-HT_{1A}$ estão envolvidos na modulação da atividade dopaminérgica (Díaz-Mataix et al., 2005; Meunier et al., 2015;). Meunier et al., (2015) mostraram que a ativação dos receptores D_1 orienta a plasticidade para a potencialização a longo prazo (LTP) e isto depende dos receptores $5-HT_{1A}$, pois a falta do receptor $5-HT_{1A}$ limita o aumento da corrente de NMDA normalmente observada na presença do agonista D_1 (Meunier et al., 2015).

A enzima tirosina hidrolase é importante para a síntese de noradrenalina e dopamina, e a administração do inibidor enzimático AMPT pode ser uma ferramenta útil para avaliar se os níveis endógenos destas catecolaminas podem contribuir para os efeitos observados com diferentes compostos. A administração prévia de 4 horas com AMPT leva a uma redução por volta de 53% e 57% nos níveis de noradrenalina e dopamina, respectivamente (Mayorga et al., 2001). O pré-tratamento com AMPT reverteu o efeito do composto LQFM212, mostrando que os níveis endógenos de NE e DA contribuem para os efeitos encontrados com este composto. Entretanto, este resultado precisa ser melhor esclarecido para mostrar exatamente em que estágio da neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica o composto LQFM212 poderia atuar, além da ativação direta dos receptores noradrenérgicos (α_1) e dopaminérgicos (D_1 e $D_{2/3}$).

A conectividade funcional entre os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico pode ser usada para uma variedade de estratégias que visem a melhoria da eficácia farmacológica em pacientes com transtorno depressivo resistente

(Blier; Mansari, 2013). Os resultados indicam que o composto LQFM212 poderia modular as vias monoaminérgicas como um todo, o que pode melhorar a eficácia e a aderência ao tratamento farmacológico. Entretanto, é importante ressaltar que é possível que o efeito terapêutico dos antidepressivos disponíveis não dependa apenas da ação sobre as monoaminas, uma vez que a concentração das mesmas na fenda sináptica aumenta rapidamente após o início do tratamento farmacológico, mas seu efeito terapêutico leva algumas semanas para aparecer (Krishnan; Nestler, 2008). Interessantemente, evidências indicam que o aumento da sinalização da neurotransmissão monoaminérgica induz a mudanças na neuroplasticidade (Liu et al., 2017).

As neurotrofinas, especialmente o BDNF, parecem desempenhar um papel importante nos transtornos depressivos, uma vez que estes fatores estão relacionados à sobrevivência e ao crescimento neuronal (Duman et al., 2000). Em particular, agentes glutamatérgicos como a cetamina induzem um rápido aumento da BDNF hipocampal após tratamento agudo (Garcia et al., 2008), entretanto, a upregulação de BDNF geralmente é dependente de tratamento crônico com medicamentos antidepressivos (Nestler et al., 2002; Castrén; Antila, 2017). Os resultados mostrados aqui são semelhantes aos dos antidepressivos típicos, uma vez que os níveis hipocampais de BDNF aumentaram com o tratamento com doses repetidas de LQFM212 por 15 dias, mas não com uma dose única. Outro derivado piperazínico, LQFM104, também foi capaz de aumentar os níveis de BDNF hipocampais após tratamento repetido (Rodrigues, 2015).

Vários achados sugerem que o aumento da expressão de BDNF e melhora da arborização dendrítica dos neurônios hipocampais resulta da administração a longo prazo de medicamentos antidepressivos (Donati; Rasenick, 2003; Russo-Neustadt; Chen, 2005; Castrén; Antila, 2017), além disso, estudos mostram que a aplicação direta de BDNF no hipocampo mostrou ter efeitos antidepressivos em modelos animais, mostrando que o próprio BDNF é capaz de produzir uma resposta antidepressiva (Russo-Neustadt; Chen, 2005; Shirayama et al., 2002). Ações do BDNF nas vias monoaminérgicas também tem sido relatadas, entre elas, como um potente fator neurotrófico para o sistema serotoninérgico, além de efeitos neuroprotetores e neurorestauradores bem documentados sobre os neurônios dopaminérgicos, e regulação da tirosina hidroxilase (Mamounas et al., 1995; Fukuchi et al., 2020; Palasz et al., 2020). O fato de que o BDNF ativa o gene promotor da

tirosina hidroxilase pode estar subjacente aos efeitos estimuladores de BDNF na diferenciação não apenas dos neurônios dopaminérgicos, mas também noradrenérgicos no cérebro (Fukuchi et al., 2020). Em geral, as doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas demonstraram ser parcialmente causadas por defeitos na plasticidade sináptica, associados à insuficiência do suprimento neuronal de BDNF e outros fatores neurotróficos. Por esta razão, estratégias para aumentar os níveis de BDNF tornam-se ferramentas na prevenção e terapia de doenças neurológicas (Palasz et al., 2020; Autry; Monteggia, 2012).

Ademais, também foi avaliadas possíveis indicações de efeitos adversos em alguns órgãos, após tratamento por via oral com o composto LQFM212 em doses repetidas. O peso corporal dos animais foi monitorado diariamente, e não houve nenhuma alteração quando comparado aos animais do grupo controle. Sabe-se que o fígado é o principal órgão de metabolização de xenobióticos e o rim é o principal órgão de eliminação do organismo, e na presença de substâncias tóxicas ocorre aumento nos níveis de AST, ALT, ureia e creatinina que podem ser usadas como indicadores de função nestes órgãos (Gowda et al., 2010; Gu; Manauto, 2013; McGill et al., 2016). Outro parâmetro importante para esta avaliação, são os níveis de glutathione, uma vez que este tripeptídeo estabelece reações de conjugação com os xenobióticos a fim de promover a eliminação destes (Rodrigues-Neto, 2010). O tratamento por via oral por 15 dias com o composto LQFM212 não alterou nenhum dos parâmetros avaliados, tornando este composto um promissor candidato a protótipo de fármaco antidepressivo.

É importante ressaltar que os transtornos depressivos apresentam neurobiologia complexa, e a desregulação de uma gama de fatores, vias intracelulares e neurotransmissões podem estar presentes nestas patologias. Além disso, alterações neurológicas e neuroanatômicas, que resultam em um estado depressivo, variam desde redução da proliferação celular, evidenciada por perda de neurônios e células gliais, a atrofia e consequente redução do volume de regiões cerebrais como hipocampo e CPF (Gould et al., 2000; McEwen, 2000; Drevets, 2001; Hollos et al., 2018). Estudos de neuroimagem em cérebros de pacientes depressivos, mostram que além de alterações estruturais também pode ocorrer alterações metabólicas em regiões do sistema de recompensa que se comunicam diretamente com o circuito núcleo *accumbens* - área tegmental ventral (Russo; Nestler, 2013). Estas alterações podem ser resultantes da interação de diversos fatores, além das vias já discutidas -

neurotransmissão monoaminérgica e fatores neurotróficos - outras condições como hiperativação do eixo HPA, excitotoxicidade glutamatérgica, vulnerabilidade ao estresse, infecção bacteriana ou viral com ativação imunológica e inflamatória, entre outros, contribuem para o início e manutenção da depressão (Duman et al., 2000; Tokita et al., 2012; Canli, 2014).

Várias citocinas pró-inflamatórias são conhecidas pela capacidade que têm de ativar o eixo HPA, astrócitos e micróglia. Reações inflamatórias no SNC, também chamada de neuroinflamação, prejudicam a função de várias áreas cerebrais, por exemplo, regiões envolvidas na coordenação motora, memória e humor (Davis; Bailey, 1997; Walker et al., 2014). Tem sido demonstrado que aumento de cortisol e/ou de citocinas pró-inflamatórias podem levar a danos em diferentes neurotransmissões, como nas vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e dopaminérgicas, e relacionam-se com sintomas depressivos, além de sintomas ansiosos (Müller; Ackenheil, 1998; Leonard, 2001; Nishida et al., 2002; Flores-Martinez et al., 2018). O modelo de neuroinflamação induzida por LPS é descrito na literatura em diferentes protocolos, porém, em todas as condições testadas visam a geração de um estado neuroinflamatório. Já foi demonstrado que tanto a administração sistêmica quanto a administração diretamente no cérebro de LPS levam a neuroinflamação (Bonow et al., 2009; Flores-Martinez et al., 2018; Batista et al., 2019). A administração de LPS simula uma inflamação nos animais, situação na qual vias imunológicas são ativadas.

No protocolo seguido neste trabalho, foi administrado LPS na dose de 1 mg/kg de maneira sistêmica aos camundongos, por via intraperitoneal, 24 horas antes dos testes comportamentais. Inicialmente, foram analisados os efeitos de LQFM212 e do controle positivo buspirona na ausência de LPS, ou seja, utilizando pré-tratamento com salina. Ambos os tratamentos não alteraram a atividade locomotora e exploratória geral, e mostraram resultados indicativos de atividades tipo-ansiolítica e tipo-antidepressiva, nos testes de campo aberto, caixa claro-escuro, nado forçado e suspensão pela cauda, respectivamente, em concordância com dados previamente publicados (Olivier et al., 2000; Martínez-Mota et al., 2002; Sato et al., 2008; Moreira et al., 2020; Moreira et al., 2021). Posteriormente, buscou-se verificar se a administração de LPS alterava a locomoção e exploração dos animais, e se induzia comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo, nos testes mencionados acima, e ainda, se o tratamento com LQFM212, bem como o controle positivo, reverteram os

efeitos causados pela administração prévia de LPS, isto é, se os efeitos tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo seriam mantidos em animais pré-tratados com LPS.

Os grupos experimentais utilizados no modelo de neuroinflamação induzida por LPS, nas condições testadas neste trabalho, não alteraram o número total de áreas invadidas no teste do campo aberto, corroborando com resultados já publicados (Sato et al., 2008; O'Connor et al., 2009; Moreira et al., 2020). Nas primeiras horas após a administração de LPS, entre 2-6 horas, pode ser observado uma redução da atividade locomotora, devido ao comportamento doentio, entretanto, após 24 horas estes parâmetros retornam para níveis considerados normais (Swiergiel; Dunn, 2007; O'Connor et al., 2009; Silva; Giusti-Paiva, 2015; Remus; Dantzer, 2016; Flores-Martinez et al., 2018; Wang et al., 2018). Dessa forma, 24 horas após a administração de LPS pode ser considerado o melhor intervalo para avaliar atividades mais específicas, como comportamentos depressivos e ansiogênicos, uma vez que os testes comportamentais utilizados são analisados com base em comportamentos que necessitam que a atividade corporal e locomoção dos animais estejam preservadas; consequentemente, uma interpretação ideal da emocionalidade depende da separação de fatores não-emocionais, como por exemplo a atividade locomotora (Gray, 1979; Stanford, 2007; Ramos, 2008; Seibenhener; Wooten, 2015; Remus; Dantzer, 2016).

Um aumento da exploração dos animais na periferia e/ou redução da exploração na zona central do campo aberto pode ser considerado como um efeito sugestivo de comportamento tipo-ansiogênico. O pré-tratamento com LPS reduziu a preferência pela zona central, demonstrada pela redução do %TCentro, além disso, também reduziu a atividade exploratória vertical, demonstrado pelo menor número de levantadas. O comportamento de levantadas acontece quando os animais ficam em pé em ambas as patas traseiras, em posição vertical; a interpretação desse resultado não possui indicação clara, entretanto, alguns estudos indicam que a diminuição deste comportamento poderia estar relacionado com uma resposta ansiogênica (Costall et al., 1989; Seibenhener; Wooten, 2015). O pré-tratamento com LPS também aumentou a frequência de autolimpeza e o tempo de imobilidade, o que pode se correlacionar com um maior nível de emocionalidade dos animais, mais especificamente, com comportamento estereotipado e congelamento, respectivamente (Doyle; Yule, 1959; Schaefer, 1963; Archer, 1973; Liu et al., 2021).

Em suma, os resultados encontrados no teste do campo aberto indicam que a

dose utilizada de LPS não apresenta risco exacerbado de levar a falso-positivos nos demais testes comportamentais, uma vez que não alterou o número de áreas invadidas, e ainda que este pré-tratamento causou nos animais alterações comportamentais sugestivas de efeito ansiogênico. O tratamento por via oral com LQFM212 reverteu, pelo menos em parte, os efeitos causados pelo LPS em relação aos parâmetros de %TCentro, frequência de levantadas e tempo de imobilidade. O controle positivo, buspirona, apresentou efeitos semelhantes, uma vez que reverteu o efeitos do LPS em relação ao %CrCentro e %TCentro. Com base nos resultados encontrados no teste do campo aberto, e sabendo que depressão e ansiedade podem se apresentar em comorbidades (Brown et al., 2001; Breteler et al., 2021), outros resultados com o composto em estudo, LQFM212, mostraram que este composto apresenta efeito tipo-ansiolítico em camundongos (Moreira et al., 2020) e que neste mesmo modelo de neuroinflamação induzida por LPS, o tratamento por via oral com LQFM212 também reverteu parte do comportamento tipo-ansioso causado pelo LPS (Moreira et al., 2023).

Prosseguindo com o estudo da atividade tipo-antidepressiva do composto LQFM212, no modelo de neuroinflamação induzida por LPS, os animais foram avaliados em dois testes específicos para esta atividade: nado forçado e suspensão pela cauda. Ambos os testes avaliam os animais sob condições aversivas, estressantes e inescapáveis. No teste NF, o pré-tratamento com LPS reduziu o tempo de latência à imobilidade e os comportamentos ativos (nado e escalada), além disso, aumentou o tempo de imobilidade, e estes resultados são indicativos de comportamento tipo-depressivo; ambos os tratamentos com LQFM212 e com controle positivo buspirona reverteram os efeitos causados pelo LPS neste teste. Resultados semelhantes foram encontrados com o teste de suspensão pela cauda, visto que os animais pré-tratados com LPS reduziram o tempo de latência e aumentaram o tempo de imobilidade, e o tratamento com LQFM212 reverteu tais efeitos causados pelo LPS. Já o tratamento com buspirona reverteu apenas o parâmetro de latência à imobilidade.

Ao final da análise comportamental é possível concluir que após o modelo de neuroinflamação induzida por LPS os animais apresentaram comportamentos do tipo-ansioso e tipo-depressivo, e que o tratamento com LQFM212 reverteu, pelo menos em parte, tais efeitos. O controle positivo, buspirona, apresentou efeitos semelhantes. Dados da literatura tem mostrado que o comportamento tipo-depressivo induzido por LPS pode ser revertido por antidepressivos que visam a modulação de serotonina

(Yirmiya et al., 2001; Ohgi et al., 2013; Dong et al., 2016), e estes estão em concordância com os resultados encontrados neste trabalho, visto que a serotonina é importante para o mecanismo de ação de LQFM212 e buspirona. Ademais, ao final dos testes comportamentais os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de soro foram utilizadas para quantificação de citocinas pró- (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), na expectativa de melhor caracterizar a ação de LQFM212 sobre os efeitos causados pelo LPS. Diferentes trabalhos mostram que a administração de LPS ativa resposta imune, resultando em liberação de uma variedade de citocinas, bem como alterações neuroendócrinas e neuroquímicas (Maes, 1995; Alexander; Rietschel, 2001; Lu et al., 2008).

Estudos tem mostrado que a IL-1 β pode estimular a produção de proteínas neurotóxicas, inibir a secreção de fatores neuroprotetores, promover toxicidade direto nas células nervosas e inibir a regeneração dos neurônios. Além disso, uma expressão excessiva da IL-1 β pode acarretar hiperatividade no eixo HPA, levando a níveis elevados de glicocorticoides (Goshen et al., 2008; Gadek-Michalska et al., 2013; Ye et al., 2013). As citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , também podem ativar a via do NF- κ B (Beg et al., 1993; Ghosh; Karin, 2002), que regula a síntese e expressão dessas citocinas, gerando um ciclo que agrava ainda mais a resposta inflamatória (Homann; Baltimore, 2006; Zhang et al., 2019). Nossos resultados mostram que ambos os tratamentos, LQFM212 ou buspirona, reduziram os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β , aumentados pela administração de LPS. Evidências apontam que o LPS é capaz de aumentar a concentração de citocinas pró-inflamatórias no soro e no SNC, após administração periférica e/ou central (Perry, 2004; Beurel; Joep, 2009; Erickson; Banks, 2011; Remus; Dantzer, 2016; Zhao et al., 2019), e compostos que reduzem a concentração no soro também o fazem no cérebro, por exemplo, resultados com o antidepressivo fluoxetina mostraram uma redução sérica e central dessas citocinas em modelos de depressão induzido por LPS (Li et al., 2021) e por estresse crônico (Lu et al., 2017), dessa forma podemos especular que talvez LQFM212 também consiga reduzir estas citocinas em áreas cerebrais.

Ademais, níveis aumentados de TNF- α e IL-1 β podem ativar o SERT e promover recaptação de serotonina, e conseqüentemente pode levar a estados depressivos devido à redução de 5-HT nas sinapses (Zhu et al., 2006). A ativação da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) por citocinas pró-inflamatórias também altera a neurotransmissão serotoninérgica (Capuron et al., 2002; O'Connor et al.,

2009). A IDO é expressa em células imunes periféricas e centrais, e degradada o triptofano ao longo da via das quinureninas, resultando em impacto negativo na via serotoninérgica pela redução da biodisponibilidade de triptofano (precursor de 5-HT) e aumento da síntese de metabólitos neuroativos, como o ácido quinolínico, um agonista de receptores NMDA, que causa excitotoxicidade e significante danos neuronais (Stone; Perkins, 1981; O'Connor et al., 2009; Maes et al., 2011, Zhang et al., 2019). IFN- γ é um potente indutor da ativação de IDO; e TNF- α e IL-1 β também podem induzir a ativação desta enzima sinergicamente (Wirleitner et al., 2003; Oxenkrug, 2007; Myint; Kim, 2014). Uma alta concentração de IFN- γ pode agravar lesões aos neurônios por estresse oxidativo, ter um efeito tóxico e alterar crescimento e diferenciação das células estaminais neurais (Kim et al., 2002; Kim et al., 2007).

Apesar das vias mencionadas acima não terem sido avaliadas por completo nesse trabalho, pode-se sugerir que talvez LQFM212 também consiga modular alguns desses aspectos, visto que a via serotoninérgica parece estar envolvida no mecanismo de ação de LQFM212 em relação a efeitos tipo-ansiolítico (Moreira et al., 2020) e tipo-antidepressivo (Moreira et al., 2021), o que poderia reduzir o desequilíbrio entre as ações das enzimas IDO/triptofano hidroxilase; além disso, o tratamento com este composto mostrou efeitos semelhantes a outras substâncias no modelo de neuroinflamação induzida por LPS, em relação aos testes comportamentais e quantificação de citocinas pró-inflamatórias, como o Honokiol, extraído de *Magnolia officinalis*. Esta substância reduziu os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , e causa menor expressão de NF- κ B, IDO e metabólitos da via das quinureninas (Zhang et al., 2019). Também é proposto que Honokiol possui um efeito antioxidante (Liou et al., 2003), e LQFM212 possui em sua estrutura química um hidroxitolueno butilado (BHT), que também apresenta perfil antioxidante (Grillo et al., 1999).

O funcionamento do sistema imune é finamente equilibrado pela atividade de enzimas e citocinas pró- e anti-inflamatórias (Charles, 2010). As células Th1 (fenótipo M1) produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , que levam à ativação de macrófagos, conduzindo à inflamação. Por outro lado, as células Th2 (fenótipo M2) produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, que estimulam a produção de anticorpos pelas células B e atuam de forma antagônica com as citocinas do tipo Th1 (Mosmann; Coffman, 1989; Li et al., 2014). A micróglia responde de forma comparável aos macrófagos em paradigmas de fenótipos M1/M2 (Michelucci et al., 2009; Ponomarev et al., 2007), dessa forma, a necessidade do balanço entre

citocinas pró- e anti-inflamatórias se estende ao cérebro, por exemplo, um estudo mostrou que camundongos *knockout* para IL-10 apresentaram maior comportamento doentio após a administração intraperitoneal de LPS do que camundongos selvagens (Leon et al., 1999). Inversamente, camundongos com superexpressão de IL-10 exibem resultados sugestivos de comportamento tipo-antidepressivo (Mesquita et al., 2008).

A IL-4 regula funções cerebrais como memória e aprendizagem, e camundongos *knockout* para IL-4 demonstram deficiências cognitivas em tarefas de aprendizagem espacial (Derecki et al., 2010; Gadani et al., 2012). Ademais, IL-4 também pode contribuir para a regulação da neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica, e inibir alterações comportamentais e imunológicas induzidas pela IL-1 β (Park et al., 2015). Interessantemente, IL-4 também contribui para a produção de IL-10 (Smiley; Grusby, 1998; Mitchell et al., 2017). Nossos resultados indicam que o pré-tratamento com LPS reduziu a concentração sérica de IL-4 e IL-10, por outro lado, o tratamento com LQFM212 reverteu estes efeitos causados pelo LPS, demonstrado pelo aumento dessas citocinas anti-inflamatórias. Hannestad et al. (2011) mostrou que, na ausência de outras doenças, os distúrbios depressivos são associados a aumento de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , enquanto os níveis de IL-10 encontram-se reduzidos. Diversos trabalhos mostram que a administração periférica e/ou central de LPS promove a redução de IL-4 e IL-10 no soro e cérebro (Abramova et al., 2013; Flores-Martinez et al., 2018; Zhao et al., 2019; Li et al., 2021), e que antidepressivos ISRS e IRSN conseguem reverter esses efeitos causados pelo LPS (Ohgi et al., 2013; Maia, 2017; Li et al., 2021).

Nas últimas décadas, as pesquisas têm sido intensificadas para melhor compreender a relação entre a inflamação e transtornos mentais, a partir de estudos clínicos e pré-clínicos. Pacientes depressivos podem apresentar níveis elevados de marcadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias (Kim et al., 2008; Shelton et al. 2011), proteína C reativa (Danese et al., 2008; Morris et al., 2011; Vogelzangs et al., 2012) e mieloperoxidase (Vaccarino et al., 2008). Antidepressivos podem atenuar a inflamação periférica, embora ainda não seja claro se apenas mecanismos anti-inflamatórios podem levar a uma resposta antidepressiva (Köhler et al. 2017), por exemplo, já foi demonstrado que dexametasona, um potente anti-inflamatório, não conseguiu atenuar os efeitos comportamentais causados pela administração intraperitoneal de LPS em camundongos no teste do nado forçado, mesmo com

redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias em diferentes áreas cerebrais, e aumento de BDNF no hipocampo (Horita et al., 2020). Em concordância, estudos direcionam que a redução de citocinas pró-inflamatórias no cérebro pode ser secundária a uma atividade anti-inflamatória periférica, ou ainda devido a capacidade dos compostos em reduzir a ativação da micróglia e, por conseguinte, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro que medeiam os efeitos do LPS administrado perifericamente (Konsman et al., 2002; Kelley et al., 2003; Dantzer et al., 2008; O'Connor et al., 2009). Neste sentido, uma possível atividade anti-inflamatória periférica causada pelo tratamento por via oral com LQFM212 foi analisada pela administração intraperitoneal de carragenina ou LPS usando o modelo de pleurisia.

O modelo de pleurisia é amplamente utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória aguda (Corsini et al., 2005; Florentino et al., 2017; Ramos et al., 2020), e a administração de diferentes agentes flogísticos tem por objetivo principal induzir a liberação de mediadores inflamatórios, alterar a permeabilidade vascular e migração de leucócitos para a cavidade pleural. Nossos resultados indicam que a administração de carragenina ou LPS promoveu um aumento da migração celular e da atividade da MPO, além de alterar a concentração de citocinas no exsudato pleural. Já o tratamento com LQFM212, em ambos os protocolos, reduziu a atividade da MPO, sem alterar a migração celular (total e diferencial) e a concentração de citocinas pró- (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no exsudato pleural. O controle positivo dexametasona alterou todos os parâmetros avaliados indicativos de atividade anti-inflamatória.

A atividade da MPO é geralmente considerada como comum indicador de infiltração de neutrófilos, e a redução da atividade desta enzima é frequentemente associada a uma redução da migração celular, e consequentemente, a um efeito anti-inflamatório (Lino et al., 2013; Florentino et al., 2017; Almeida et al., 2020b). A MPO é capaz de converter peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, um potente oxidante, o que contribui tanto para a sua atividade antimicrobiana, como para geração de subsequente estresse oxidativo nos tecidos (Barbier, 2000; Malle et al., 2007; Fernandes et al., 2008). No SNC, já foi mostrado que a MPO está presente em neutrófilos infiltrados, micróglia ativada, neurônios e astrócitos no cérebro após lesões isquêmicas (Chen et al., 2020). Com base nos resultados do modelo de pleurisia, o tratamento com LQFM212 leva a redução da atividade da MPO que parece ser

independente de uma atividade anti-inflamatória periférica, visto que LQFM212 não reduziu o número de leucócitos migrados para a cavidade pleural. Neste sentido, é plausível sugerir que esta redução ocorra devido a um potencial atividade antioxidante de LQFM212, uma vez que já foi proposto que além dos anti-inflamatórios, os compostos antioxidantes também têm o potencial de reduzir a atividade desta enzima (Vieira et al., 2011; Adefegha et al., 2017; Chen et al., 2020). Como já mencionado, LQFM212 possui um radical BHT em sua estrutura, e resultados prévios em ensaios eletroquímicos mostraram que LQFM212 apresenta um perfil antioxidante maior que seu precursor - LQFM032 (Moreira et al., 2023). Consistentemente, a administração sistêmica de LPS no modelo de neuroinflamação aumentou a atividade da MPO no córtex cerebral e hipocampo, e o tratamento com LQFM212 foi capaz de reduzir esta atividade em ambas as áreas cerebrais.

A administração intracerebroventricular de LPS em camundongos pode levar a danos cognitivos por gerar estresse oxidativo, bem com uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e morte neuronal por apoptose (Zhao et al., 2017). LPS ainda pode levar a aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) que resulta em redução de acetilcolina, o que pode facilitar o processo inflamatório e contribuir para os déficits cognitivos (Tyagi et al. 2008). A via colinérgica anti-inflamatória é um mecanismo neuro-humoral que desempenha um papel proeminente, suprimindo a resposta inflamatória. A liberação de acetilcolina pelo nervo vago restringe a inflamação, inibindo a ativação de leucócitos e suprimindo a liberação de citocinas por monócitos e macrófagos ativados pelo LPS. Portanto, compostos que aumentem a transmissão colinérgica podem atuar como uma abordagem potencial para prevenir a neuroinflamação.

Dados da literatura mostram que a ativação de receptores nicotínicos $\alpha 7$, é capaz de inibir significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (Ulloa, 2005) e inibidores da AChE também podem favorecer uma resposta imunitária mediada por Th2 (Reale et al., 2006). Em concordância, os resultados obtidos no modelo de neuroinflamação induzida por LPS mostraram que a administração de LPS leva a uma maior atividade da enzima ChE. O tratamento com LQFM212 *per se* não alterou a atividade desta enzima, por outro lado, reduziu o aumento da atividade da ChE causado pelo LPS, o que pode contribuir para uma menor resposta neuroinflamatória. Ademais, Moreira et al., 2020 mostraram que LQFM212 também modula vias colinérgicas pela atividade agonista em receptores nicotínicos.

Os danos oxidativos e a geração de radicais livres, bem como a redução da capacidade antioxidante em diferentes órgãos, incluindo o cérebro, aumentam significativamente com o tempo de exposição ao LPS. Halawa et al. 2018 mostraram que o LPS pode induzir estresse oxidativo após um curto período de exposição já a partir das 6h e continuando até 72h, resultante de uma diminuição significativa das enzimas de defesa antioxidantes com um aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de NO. O aumento da permeabilidade do BBB e a produção de ERONs no cérebro estão envolvidos no mecanismo de toxicidade do LPS. A formação de ERONs pelo LPS pode causar uma alteração significativa nos níveis de NO, MDA, GSH, SOD e CAT nas doenças cerebrais e vários autores sugerem que a tempestade de citocinas pró-inflamatórias desencadeada pelo LPS pode ser a base da formação de condições de estresse oxidativo (Sharma et al., 2015; Al-min et al., 2018; Peng et al., 2021).

Os nossos resultados no modelo de neuroinflamação induzida por LPS mostraram que a administração de LPS tem um efeito prejudicial significativo no córtex pré-frontal cerebral e no hipocampo, duas importantes regiões cerebrais que estão envolvidas na função cognitiva, aprendizagem e formação de memória. Por outro lado, o tratamento com LQFM212 reduziu o estresse oxidativo gerado pelo LPS em ambas as áreas cerebrais, demonstrado pela redução dos níveis de nitritos e atividade da enzima MPO, e pelo aumento dos níveis de GSH. Ademais, nas mesmas condições experimentais LQFM212 também reduziu a peroxidação lipídica, os níveis de proteínas carboniladas e aumentou atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no córtex pré-frontal e hipocampo (Moreira et al., 2023). Interessantemente, avaliando os efeitos do LQFM212 *per se*, os resultados indicam que os níveis de GSH foram aumentados em ambas as áreas cerebrais, córtex pré-frontal e hipocampo, sugerindo um potencial efeito antioxidante *in vivo* consistente com os resultados *in vitro* encontrados por Moreira et al., 2023 em ensaios eletroquímicos.

LPS pode induzir uma desregulação da sinalização do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), um componente chave na defesa antioxidante modulado pelas células em resposta ao estresse oxidativo. Quando ativado, o Nrf2 aumenta a expressão de antioxidantes endógenos, e após inflamação persistente e aumento do nível de ERONs, os mecanismos de defesa antioxidantes dos tecidos são saturados ao ponto de se tornarem ineficazes (Anderson et al., 2014; Kang et al., 2020; Xu et al., 2022). O potencial terapêutico dos compostos antioxidantes como tratamento coadjuvante aos medicamentos antidepressivos tem sido discutido (Scapagnini et al., 2012;

Riveros et al., 2022). Fatores neurotróficos, como o BDNF, podem ativar Nrf2 (Bruna et al., 2018), e anomalias na via cerebral Nrf2-BDNF foram propostas para desempenhar um papel na causa de fenótipos semelhantes à depressão em roedores (Yao et al., 2016; Yao et al., 2021). Estudos demonstraram que os camundongos knockout (KO) para Nrf2 mostraram uma diminuição dos níveis cerebrais de BDNF e do seu receptor TrkB, resultando assim em comportamentos depressivos, por outro lado, o agonista do receptor TrkB, 7,8-dihidroxivona, promoveu efeitos antidepressivos nos camundongos Nrf2 KO (Yao et al., 2016). Interessantemente, nossos resultados apontam que LQFM212 aumenta os níveis hipocâmpais de BDNF, tornando-o um composto promissor neste campo.

6 CONCLUSÃO

O composto LQFM212 mostrou efeitos sugestivos de atividade tipo-antidepressiva em camundongos, que provavelmente envolvem, direta e/ou indiretamente, as vias monoaminérgicas. O tratamento com doses repetidas com este derivado piperazínico aumentou os níveis hipocâmpais de BDNF, o que sugere mudanças na neuroplasticidade sináptica após tratamento a longo prazo, possivelmente, como um mecanismo subjacente ao efeito tipo-antidepressivo do composto. Além disso, após a administração por via oral durante 15 dias com LQFM212, não houve nenhum efeito indicativo de toxicidade nos parâmetros avaliados, tornando este composto um promissor candidato a um protótipo de fármaco antidepressivo. No modelo de neuroinflamação induzida por LPS, o tratamento com LQFM212 reverteu o comportamento tipo-depressivo, o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a redução de citocinas anti-inflamatórias, e as alterações relacionadas ao estresse oxidativo causado pelo LPS. Estes efeitos não parecem ser secundários a uma ação anti-inflamatória periférica de LQFM212, visto que este composto não conseguiu reduzir as alterações causadas pela carragenina ou LPS no modelo de pleurisia. Por outro lado, o tratamento com LQFM212 reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase no exsudato pleural, no córtex pré-frontal e hipocampo, além de aumentar per se os níveis de glutathione em ambas regiões cerebrais, sugerindo dessa forma que uma possível atividade antioxidante *in vivo* possa contribuir para os efeitos observados no modelo de neuroinflamação induzida por LPS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramova, A.Y. et al. (2013), "Cytokine levels in rat blood and brain structures after administration of lipopolysaccharide" *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 155(4), pp. 417-20.
- Adefegha, S.A. et al. (2017), "Hesperidin attenuates inflammation and oxidative damage in pleural exudates and liver of rat model of pleurisy" *Redox Report* 22(6), pp. 563-571.
- Akira, S., Takeda, K. (2004), "Toll-like receptor signalling" *Nature Reviews Immunology* 4(7), pp. 499-511.
- Al-Amin, M.M. et al. (2018), "Pretreatment with risperidone ameliorates systemic LPS-induced oxidative stress in the cortex and hippocampus" *Frontiers in Neuroscience* 12(384).
- Alexander, C., Rietschel, E.T. (2001), "" *Journal of Endotoxin Research* 7(3), pp. 167-202.
- Almeida, P.G.C. et al. (2020a), "Neuroinflammation and glial cell activation in mental disorders" *Brain, Behavior, and Immunity – Health* 2, 100034.
- Almeida, D.S. et al. (2020b), "Investigation of anti-inflammatory potential of 5-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione compound" *European Journal of Pharmacology* 886, 173388.
- Aloisi, F. (2001), "Immune function of microglia" *Glia* 36(2), pp. 165-179.
- Anderson, G., Maes, M. (2014), "Oxidative/nitrosative stress and immuno-inflammatory pathways in depression: treatment implications" *Current Pharmaceutical Design* 20(23), pp. 3812-3847.
- APA - American Psychiatric Association (2022), "Diagnostic and statistical manual of mental disorders - DSM-V-TR". 5th ed. Text revision, Arlington, Ed. *American Psychiatric Publishing*.
- Archer, J. (1973), "Tests for emotionality in rats and mice: a review" *Animal Behaviour* 2(21), pp. 205-245.
- Autry, A.E., Monteggia, L.M. (2012), "Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders" *Pharmacological Reviews* 64(2), pp. 238-258.
- Baker, M.A., Cerniglia, G.J., Zaman, A. (1990), "Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples" *Analytical Biochemistry* 190(2), pp. 360-365.
- Bao, A-M., Swaab, D.F. (2019), "The human hypothalamus in mood disorders: The HPA axis in the center" *IBRO Reports* 6, pp. 45-53.

- Barbior, B.M. (2000), "Phagocytes and oxidative stress" *The American Journal of Medicine* 109(1), pp. 33-44.
- Barnes, N.M., Sharp, T. (1999), "A review of central 5-HT receptors and their function" *Neuropharmacology* 38(8), pp. 1083-1152.
- Bastos, T.C.N.M. (2011), "A Neurobiologia da Depressão", Dissertação (Mestrado integrado em medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto.
- Batista, C.R.A. et al. (2019), "Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration" *International Journal of Molecular Sciences* 20(9), pp. 2293.
- Beg, A.A. et al. (1993), "Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: A mechanism for NF-kappa B activation" *Molecular and Cellular Biology* 13(6), pp. 3301-3310.
- Belujon, P., Grace, A.A. (2017), "Dopamine system dysregulation in major depressive disorders" *International Journal of Neuropsychopharmacology* 20(12), pp. 1036-1046.
- Berton, O., Nestler, E.J. (2006), "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines" *Nature Reviews Neuroscience* 7(2), pp. 137-151.
- Beurel, E., Jope, R.S. (2009), "Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain" *Journal of Neuroinflammation* 6(9).
- Blier, P., Mansari, M.E. (2013), "Serotonin and beyond: therapeutics for major depression" *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368(1615), 20120536.
- Bondy, B. (2002), "Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment" *Dialogues in Clinical Neuroscience* 4(1), pp. 7-20.
- Bonow, R.H. et al. (2009), "The brain expression of genes involved in inflammatory response, the ribosome, and learning and memory is altered by centrally injected lipopolysaccharide in mice" *The Pharmacogenomics Journal* 9(2), pp. 116-126.
- Borges-Filho, C. (2014), "Avaliação da bioatividade do flavonóide crisina em camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível" Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul.
- Bradford, M.M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Analytical Biochemistry* 72, pp. 248-254.
- Brito, A.F. et al. (2012), "Central pharmacological activity of a new piperazine derivative: 4-(1-phenyl-1h-pyrazol-4-ylmethyl)-piperazine-1-carboxylic acid ethyl ester" *Life Sciences* 90(23-24), pp. 910-916.

Brito, A.F. et al. (2017), "Anxiolytic-like effect of 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol is mediated through the benzodiazepine and nicotinic pathways" *Chemical Biology and Drug Design* 90(3), pp. 432-442.

Brito, A.F. et al. (2018), "A new piperazine derivative: 1-(4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)piperazin-1-yl)-2-methoxyethan-1-one with antioxidant and central activity" *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 391(3), pp. 255-269.

Bruna, B. et al. (2018), "The signaling pathways underlying BDNF-induced Nrf2 hippocampal nuclear translocation involve ROS, RyR-Mediated Ca²⁺ signals, ERK and PI3K" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 505(1), pp. 201-207.

Campêlo, L.M. et al. (2011), "Antioxidant and antinociceptive effects of Citrus limon essential oil in mice" *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 11, pp. 673-678.

Campos, A.C. et al. (2013), "Animal models of anxiety disorders and stress" *Revista brasileira de psiquiatria* 35(Suppl 2), pp. S101-111.

Can, A. et al. (2012), "The mouse forced swim test" *Journal of Visualized Experiments* 59, e3638.

Canli, T. (2014), "Reconceptualizing major depressive disorder as an infectious disease" *Biology of Mood and Anxiety Disorders* 4(1), pp. 10.

Capuron, L. et al. (2002), "Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy" *Molecular Psychiatry* 7(5), pp. 468-473.

Carvalho, H.W. et al. (2014), "The joint structure of major depression, anxiety disorders, and trait negative affect" *Revista brasileira de psiquiatria* 36(4), pp. 285-292.

Casaril, A.M. et al. (2019) "Depression- and anxiogenic-like behaviors induced by lipopolysaccharide in mice are reversed by a selenium-containing indolyl compound: Behavioral, neurochemical and computational insights involving the serotonergic system" *Journal of Psychiatric Research* 115, pp. 1-12.

Castrén, E. (2005), "Is mood chemistry?" *Nature Reviews Neuroscience* 6(3), pp. 241-246.

Castrén, E., Rantamaki, T. (2010), "The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity" *Developmental Neurobiology* 70(5), pp. 289-297.

Castrén, E., Antila, H. (2017), "Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses" *Molecular Psychiatry* 22(8), pp. 1085-1095.

Celada, P., Bortolozzi, A., Artigas, F. (2013), "Serotonin 5-HT_{1A} receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research" *CNS Drugs* 27(9), pp. 703-716.

Chamberlain, S.R., Robbins, T.W. (2013), "Noradrenergic modulation of cognition: therapeutic implications" *Journal of Psychopharmacology* 27(8), pp. 694-718.

Chaouloff, F. et al. (1997), "Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlórdiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests" *Behavioural Brain Research* 85(1), pp. 27-35.

Charles, A.D. (2010), "Anti-inflammatory agents: present and future" *Cell* 140, 935-950.

Chen, L. et al. (2015), "Novel insights into the behavioral analysis of mice subjected to the forced-swim test" *Translational Psychiatry* 5(4), e551.

Chen, S. et al. (2020), "Targeting myeloperoxidase (MPO) mediated oxidative stress and inflammation for reducing brain ischemia injury: potential application of natural compounds" *Frontiers in Physiology* 11, pp. 433.

Chung, D.W. et al. (2010), "Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus" *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(4), pp. 531-541.

Ciraulo, D.A., Shader, R.I., Greenblatt, D.J. (2011), "Clinical pharmacology and therapeutics of antidepressants" In: Ciraulo, D.A., Shader, R.I. *Pharmacotherapy of depression*, 2th ed., Ed. Springer, Philadelphia, USA.

Claes, S. (2009), "Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1179, 216-228.

Cleare, A. et al. (2015), "Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2008 British Association for Psychopharmacology guidelines" *Journal of psychopharmacology* 29, pp. 459-525.

Corsini, E. et al. (2005), "Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats" *Immunology* 115(2), pp. 253-261.

Costa, A.P.R. (2021), "Estudos da estrutura comportamental de camundongos nos testes do nado forçado e da suspensão pela cauda" Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Costa, E.A. et al. (2013), "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 - a 4-nerolidylcatechol derivative" *Life Sciences* 92, pp. 237-244.

Costall, B. (1989), "Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 32(3), pp. 777-785.

Crane, G.E. (1956), "The psychiatric side-effects of iproniazid" *American Journal of Psychiatry* 112(7), pp. 494-501.

Crawley, J.N. (1981), "Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 15(5), pp. 695-699.

Crawley, J.N., Goodwin, F.K. (1980), "Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 13, pp. 167-170.

Cregan, S.P. et al. (2002), "Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death" *Journal of Cell Biology* 158(3), pp. 507-517.

Cronkite, R.C. et al. (2013), "Life stressors and resources and the 23-year course of depression" *Journal of Affective Disorders* 150(2), pp. 370-377.

Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I. (2002), "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs" *Trends in Pharmacological Sciences* 23(5), pp. 238-245.

Cusin, C. et al. (2013), "A randomized, double-blind, placebocontrolled trial of pramipexole augmentation in treatment-resistant major depressive disorder" *Journal of Clinical Psychiatry* 74(7), pp. 636-641.

Czura, C.J., Tracey, K.J. (2005), "Autonomic neural regulation of immunity" *Journal of Internal Medicine* 257(2), pp. 156-166.

da Ré, C.F. (2015), "O lipopolissacarídeo altera a comunicação da leptina em hipocampo de ratos Wistar" Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Dailly, E. et al. (2004), "Dopamine, depression and antidepressants" *Fundamental and Clinical Pharmacology* 18(6), pp. 601-607.

Dale, E., Bang-Andersen, B., Sanchez, C. (2015), "Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs" *Biochemical Pharmacology* 95(2), pp. 81-97.

Danese, A. et al. (2008), "Elevated inflammation levels in depressed adults with a history of childhood maltreatment" *Archives of General Psychiatry* 65(4), pp. 409-415.

Dantzer, R. et al. (2008), "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain" *Nature Reviews Neuroscience* 9(1), pp. 46-56.

Davis, J.M.; Bailey, S.P. (1997), "Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise" *Medicine and Science in Sports and Exercise* 29(1), pp. 45-57.

Deardorff, W.J. and Grossberg, G.T. (2014), "A review of the clinical efficacy, safety and tolerability of the antidepressants vilazodone, levomilnacipran and vortioxetine" *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 15, pp. 2525-2542.

Derecki, N.C. (2010), "Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4" *Journal of Experimental Medicine* 207(5), pp. 1067-1080.

Detke, M.J., Lucki, I. (1995), "Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth" *Behavioural Brain Research* 73(1-2), pp. 43-46.

Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I. (1995), "Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants" *Psychopharmacology (Berl)* 121(1), pp. 66-72.

Díaz-Mataix L. et al. (2005), "Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action" *Journal of Neuroscience* 25(47), pp. 10831-10843.

Dollinger, M.J., Holloway, W.R., Denenberg, V.H. (1980), "The development of Behavioral competence in the rat" In: *Maternal Influences and early Behavior*, ed. Bell, R.W. and Smotherman, W.P. Ed. SP Medical and Scientific Books, New York.

Donati, R.J.; Rasenick, M.M. (2003), "G protein signaling and the molecular basis of antidepressant action" *Life Sciences* 73(1), pp. 1-17.

Dong, C. et al. (2016), "Effects of escitalopram, R-citalopram, and reboxetine on serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 144, pp. 7-12.

Dowlati, Y. et al. (2010), "A meta-analysis of cytokines in major depression" *Biological Psychiatry* 67(5), pp. 446-457.

Doyle, G., Yule, E.P. (1959), "Grooming activities and freezing behaviour in relation to emotionality in albino rats" *Animal Behaviour* 7(1-2), pp. 18-22.

Drevets, W.C. (2000), "Neuroimaging studies of mood disorders" *Biological psychiatry* 48(8), pp. 813-829.

Drevets, W.C. (2001), "Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders" *Current Opinion in Neurobiology* 11, pp. 240-249.

Drevets, W.C. et al. (2022), "Immune targets for therapeutic development in depression: towards precision medicine" *Nature Reviews Drug Discovery*.

Duman, R.S. et al. (2000), "Neuronal plasticity and survival in mood disorders" *Biological Psychiatry* 48(8), pp. 732-739.

Duman, R.S., Monteggia, L.M. (2006), "A neurotrophic model for stress-related mood disorders" *Biological Psychiatry* 59(12), pp. 1116-1127.

Elias, E.; Zhang, A.Y.; Manners, M.T. (2022), "Novel pharmacological approaches to the treatment of depression" *Life* 12, pp. 196.

Ellman, G.L. et al. (1961), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity" *Biochemical Pharmacology* 7, pp. 88-95.

Erickson, M.A., Banks, W.A. (2011), "Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis" *Brain, Behavior, and Immunity* 25(8), pp. 1637-1648.

Espíndola, A.M. (2012), "Estresse, emoções e câncer de mama: relações possíveis", Dissertação (Mestrado em Psicologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

Evans-Lacko, S. et al. (2018), "Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: results from the WHO World Mental Health (WMH) surveys" *Psychological Medicine* 48(9), pp. 1560-1571.

Farooq, R.K. et al. (2012), "Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation?" *Behavioural Brain Research* 231(1), pp. 130-137.

Fasipe, O.J. (2018), "Neuropharmacological classification of antidepressant agents based on their mechanisms of action" *Archives of Medicine and Health Sciences* 6(1), pp. 81-94.

Fawcett, J. et al. (2016), "Clinical experience with high-dosage pramipexole in patients with treatment-resistant depressive episodes in unipolar and bipolar depression" *American Journal of Psychiatry* 173, pp. 107-111.

Fernandes, D.C. et al. (2008), "Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*" *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 56(5), pp. 723-726.

Fernandez-Pujals, A.M. et al. (2015), "Epidemiology and heritability of major depressive disorder, stratified by age of onset, sex, and illness course in generation Scotland: scottish family health study (GS:SFHS)" *PLoS ONE* 10(11), e0142197.

Fiksdal, A. et al. (2019), "Associations between symptoms of depression and anxiety and cortisol responses to and recovery from acute stress" *Psychoneuroendocrinology* 102, pp. 44-52.

Florentino, I.F. et al. (2017), "Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide" *Nitric Oxide* 69, pp. 35-44.

Flores-Martinez, Y.M. et al. (2018), "Acute neuroinflammatory response in the substantia nigra pars compacta of rats after a local injection of lipopolysaccharide" *Journal of Immunology Research* 2018, 1838921.

Formigoni, M.L. et al. (2006), "Métodos para avaliar os efeitos do álcool" In: Almeida, R.N. Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Frenois, F. et al. (2007), "Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior" *Psychoneuroendocrinology* 32(5), pp. 516-531.

Fukuchi, M. et al. (2010), "Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca(2+) signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Brain Research* 1366, pp. 18-26.

Gadani, S.P. et al. (2012), "IL-4 in the brain: a cytokine to remember" *Journal of Immunology* 189(9), pp. 4213-4219.

Gadek-Michalska, A. et al. (2013), "Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems" *Pharmacological Reports* 65(6), pp. 1655-1662.

Galdino, P.M. et al. (2015a), "Involvement of the monoamine system in antidepressant-like properties of 4-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethyl)-piperazine-1-carboxylic acid ethyl ester" *Life Sciences* 143, pp. 187-193.

Galdino, P.M. et al., (2015b), "Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like properties of *Lafoensia pacari* A. St. Hil" *Journal of Ethnopharmacology* 170, pp. 218-225.

Garcia, L.S.B. et al. (2008), "Acute administration of ketamine induces antidepressant like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32(1), pp. 140-144.

Garcia-Garcia, A., Newman-Tancredi, A., Leonardo, E.D. (2014), "5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function" *Psychopharmacology (Berl)* 231(4), pp. 623-636.

GBD (2019), "Global Burden of Disease Study 2019", *Institute of Health Metrics and Evaluation*, disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2019-permalink/70aff86526fb1efa2e4fee0103b5b815> (Acessado 31 Janeiro 2022).

Géa, L.P. (2019), "Integrando as hipóteses inflamatória e neurotrófica na fisiopatologia dos transtornos de humor: foco nas alterações periférico-centrais e perspectivas de novos alvos terapêuticos" Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Farmacologia e Terapêutica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ghosh, S., Karin, M. (2002), "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle" *Cell* 109, S81–S96.

Goldman, L.S., Nielsen, N.H., Champion, H.C. (1999), "Awareness, diagnosis, and treatment of depression" *Journal of General Internal Medicine* 14, pp. 569-580.

Goldstein, J.M., Handa, R.J., Tobet, S.A. (2014), "Disruption of fetal hormonal programming (prenatal stress) implicates shared risk for sex differences in depression and cardiovascular disease" *Frontiers in Neuroendocrinology* 35(1), pp. 140-158.

Goshen, I. et al. (2008), "Brain interleukin-1 β mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression" *Molecular Psychiatry* 13(7), pp. 717-728.

Gould, E. et al. (2000), "Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood" *Biological psychiatry* 48(8), pp. 715-720.

Gould, T.D., Dao, D.T., Kovacsics, C.E. (2009), "The open field test" In: Gould, T.D. Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests, Series Neuromethods, vol. 42. Springer Protocols.

Gowda, S. et al. (2010), "Markers of renal function tests" *North American Journal of Medicine and Science* 2(4), pp. 170-173.

Gray, J.A. (1979), "Emotionality in male and female rodents: a reply to Archer" *The British Journal of Psychiatry* 70(3), pp. 425-440.

Green, L.C., et al. (1982), "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids" *Analytical Biochemistry* 126(1), pp. 131-138.

Grillo, C.A., Seoane, A.I., Dulout, F.N. (1999), "Protective effect of butylated hydroxytoluene (BHT) against the clastogenic activity of cadmium chloride and potassium dichromate in hamster ovary cells" *Genetics and Molecular Biology* 22(1), pp. 59-64.

Gu, X., Manautou, J.E. (2013), "Molecular mechanisms underlying chemical liver injury" *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14, e4.

Halawa, A.A. et al. (2018), "Lipopolysaccharide prompts oxidative stress and apoptosis in rats' testicular tissue" *Journal of Veterinary Healthcare* 1(3), pp. 20-31.

Harmer, C.J., Duman, R.S., Cowen, P.J. (2017), "How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches" *Lancet Psychiatry* 4(5), pp. 409-418

Han, M-H., Nestler, E.J. (2017), "Neural substrates of depression and resilience" *Neurotherapeutics* 14(3), pp. 677-686.

Hannestad, J., Dellagioia, N., Bloch, M. (2011), "The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis" *Neuropsychopharmacology* 36(12), pp. 2452-2459.

Hashimoto, K. (2009), "Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder" *Brain Research Reviews* 61(2), pp. 105-123.

Hesdorffer, D.C. et al. (2000), "Major depression is a risk factor for seizures in older adults" *Annals of neurology* 47(2), pp. 246-249.

Hillhouse, T.M., Porter, J.H. (2015), "A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate" *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 23(1), pp. 1-21.

Hollos, P., Marchisella, F., Coffey, E.T. (2018), "JNK regulation of depression and anxiety" *Brains Plasticity* 3(2), pp. 145-155.

Homann, A., Baltimore, D. (2006), "Circuitry of nuclear factor B signaling" *Immunological Reviews* 210, 171-186.

Horita, J.K.H.A. et al. (2020), "Evaluation of brain cytokines and the level of brain-derived neurotrophic factor in an inflammatory model of depression" *Neuroimmunomodulation* 27(2), pp. 87-96.

Howren, M.B., Lamkin, D.M., Suls, J. (2009), "Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis" *Psychosomatic Medicine* 71(2), pp. 171-186.

Iravani, M.M. (2002), "Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation induced dopaminergic neurodegeneration" *Neuroscience* 110(1), pp. 49-58.

Janig, W., Green, P.G. (2014), "Acute inflammation in the joint: its control by the sympathetic nervous system and by neuroendocrine systems" *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 182, pp. 42-54.

Joca, S.R.L., Padovan, C.M., Guimarães, F.S. (2003), "Estresse, depressão e hipocampo" *Revista Brasileira de Psiquiatria* 25(supl 2), pp. 45-51.

Juruena, M.F., Cleare, A.J., Pariante, C.M. (2004), "O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão" *Revista Brasileira de Psiquiatria* 26(3), pp. 189-201.

Kang, T.C. (2020), "Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) and mitochondrial dynamics/mitophagy in neurological diseases" *Antioxidants (Basel)* 9(7), pp. 617.

Kalia, M. (2005), "Neurobiological basis of depression: an update" *Metabolism* 54(5 Suppl 1), pp. 24-27.

Kelley, K.W. et al. (2003), "Cytokine-induced sickness behavior" *Brain, Behavior, and Immunity* 17(Suppl 1), pp. S112-118.

Kessler, R.C. et al. (2005), "Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication" *Archives of general psychiatry* 62(6), pp.593-602.

Kim, I-J. et al. (2002), "Interferon γ induces retrograde dendritic retraction and inhibits synapse formation" *Journal of Neuroscience* 22(11), pp. 4530-4539.

Kim, S.J. et al. (2007), "Interferon-promotes differentiation of neural progenitor cells via the JNK pathway" *Neurochemical Research* 32(8), pp. 1399-1406.

Kim, Y-K. et al. (2008), "Differences in cytokines between non-suicidal patients and suicidal patients in major depression" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32(2), pp. 356-361.

Köhler, C.A. et al. (2017), "Peripheral alterations in cytokine and chemokine levels after antidepressant drug treatment for major depressive disorder: systematic review and meta-analysis" *Molecular Neurobiology* (2017) 55(5), pp. 4195-5206.

Konsman, J.P., Parnet, P., Dantzer, R. (2002), "Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications" *Trends in Neurosciences* 25(3), pp. 154-159.

Kowalczyk-Pachel, D. et al. (2016), "Cysteine metabolism and oxidative processes in the rat liver and kidney after acute and repeated cocaine treatment" *Plos One* 11(1), e0147238.

Kowalskia, L., Delanogareb, E., Oliveira, T.B. (2021), "Um novo olhar para o tratamento do transtorno depressivo maior: uma revisão dos estudos clínicos realizados com cetamina e escetamina" *Vittalle – Revista de Ciências da Saúde* 33(3), pp. 134-154.

Krishnan, V., Nestler, E.J. (2008), "The molecular neurobiology of depression" *Nature* 455(7215), pp. 894-902.

Kubera, M. et al. (2011), "In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35(3), pp. 744-759.

Kuhn, R. (1958), "The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride)" *American Journal of Psychiatry* 115(5), pp. 459-464.

Lafer, B., Vallada-Filho, H.P. (1999), "Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos" *Revista Brasileira de Psiquiatria* 21(supl 1), pp. 12-17.

Leon, L.R. et al. (1999), "An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice" *American Physiological Society* 276(1), R81-9.

Leonard, B., Maes, M. (2012), "Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36(2), pp. 764-785.

Leonard, B.E. (2001), "The immune system, depression and the action of antidepressants" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 25(4), pp. 767-780.

- Leow-Dyke, S. et al. (2012), "Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration *in vitro*" *Journal of Neuroinflammation* 9, pp. 230.
- Li, W. et al. (2014), "Lipopolysaccharide-induced profiles of cytokine, chemokine, and growth factors produced by human decidual cells are altered by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 supernatant" *Reproductive Sciences* 21(7), pp. 939-947.
- Li, W. et al. (2021), "Fluoxetine regulates eEF2 activity (phosphorylation) via HDAC1 inhibitory mechanism in an LPS-induced mouse model of depression. *Journal of Neuroinflammation* 18(1), pp. 38.
- Lino, R.C. et al. (2013), "Anti-inflammatory effect of (E)-4-(3,7-dimethylocta-2,6-dienylamino)phenol, a new derivative of 4-nerolidylcatechol" *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65(1), pp. 133-141.
- Liou, K-T, et al. (2003), "Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production" *Brain Research* 992(2), pp. 159-166.
- Liu, B. et al. (2017), "From serotonin to neuroplasticity: evolvement of theories for major depressive disorder" *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11, 305.
- Liu, H. et al. (2021), "Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model" *Neurobiology of Stress* 15, 100417.
- Locke, A.B., Kirst, N., Shultz, C.G. (2015), "Diagnosis and management of generalized anxiety disorder and panic disorder in adults" *American Family Physician* 91(9), pp. 617-624.
- Lopes, I.S. et al. (2018), "Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: role of antioxidant and neurotrophic mechanisms" *Neurochemistry International* 120, pp. 33-42.
- Lopresti, A.L. et al. (2014), "A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 48, pp. 102-111.
- Louveau, A. et al. (2015), "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels" *Nature* 523, pp. 337-341.
- Lu, Y-C., Yeh, W-C., Ohashi, P.S. (2008), "LPS/TLR4 signal transduction pathway" *Cytokine* 42(2), pp. 145-151.
- Lu, Y. et al. (2017), "Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression" *PLoS ONE* 12(10), e0186700.

Machado, D.G. (2012), "Investigação do potencial antidepressivo de *Rosmarinus officinalis*" Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Maes, M. (1995), "Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 1995, 19(1), 11-38.

Maes, M. et al. (1998), "Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity" *Acta Psychiatrica Scandinavica* 97(4), pp. 302-308.

Maes, M. et al. (2011), "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* 35(3), pp. 702-721.

Maia, F.T.S.R (2017) "Determinação de alterações comportamentais e neuroquímicas do aprepitante no modelo crônico de depressão induzido pela administração repetida de lipopolissacarídeo em camundongos" Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Maletic, V. (2007), "Neurobiology of depression: an integrated view of key findings" *International Journal of Clinical Practice* 61(12), pp. 2030-2040.

Maletic, V., Raison, C.L. (2009), "Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain" *Frontiers in Bioscience-Landmark* 14, pp. 5291-5338.

Malle, E. et al. (2007), "Myeloperoxidase: a target for new drug development?" *British Journal of Pharmacology* 152(6), p.838-854.

Mamounas, L.A. et al. (1995), "Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain" *Journal of Neuroscience* 15(12), pp. 7929-7939.

Margis, R. et al. (2003), "Relação entre estressores, estresse e ansiedade" *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul* 25(supl 1), pp. 65-74.

Mayorga, A.J et al. (2001), "Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine (1A) and 5-hydroxytryptamine (1B) receptor mutant mice" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298(3), pp. 1101-1107.

McEwen, B.S. (2000), "Effects of adverse experiences for brain structure and function" *Biological psychiatry* 48(8), pp. 721-731.

McGill, M.R., et al. (2016), "Mechanistic biomarkers in liver diseases. In: Preedy, V. Biomarkers in liver disease: methods, discoveries and applications. Ed. Springer, Dordrecht.

- Meng, F., Lowell, C.A. (1997), "Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Srcfamily kinases Hck, Fgr, and Lyn" *Journal of Experimental Medicine* 185(9), pp. 1661-1670.
- Mesquita, A.R. et al. (2008), "IL-10 modulates depressive-like behavior" *Journal of Psychiatric Research* 43, pp. 89-97.
- Meunier, C.N.J. et al. (2015), "Effect of Dopaminergic D₁ receptors on plasticity is dependent of serotonergic 5-HT_{1A} receptors in L5-pyramidal neurons of the prefrontal cortex" *Plos one* 10(3), e0120286.
- Michelucci, A. et al. (2009), "Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta" *Journal of Neuroimmunology* 210(1-2), pp. 3-12.
- Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L. (2009), "Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression" *Biological psychiatry* 65(9), pp. 732-741.
- Miller, A.H, Raison, C.L. (2016), "The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target" *Nature Reviews Immunology* 16(1), pp. 22-34.
- Miller, S.M., Piasecki, C.C., Lonstein, J.S (2011), "Use of the light-dark box to compare the anxiety-related behavior of virgin and postpartum female rats" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 100(1), pp. 130-137.
- Mishra, A., Singh, S., Shukla, S. (2018), "Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease" *Journal of Experimental Neuroscience* 12, 1179069518779829.
- Mitchell, R.E. et al. (2017), "IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation" *Scientific Reports* 7(11315).
- Montgomery, K.C. (1958). "The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour" *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 48, pp. 254-260.
- Moreira, L.K., et al. (2020), "Neuropharmacological assessment in mice and molecular docking of piperazine derivative LQFM212" *Behavioral Brain Research* 394(112827).
- Moreira, L.K.S. et al. (2021), "Potential antidepressant-like effect of piperazine derivative LQFM212 in mice: role of monoaminergic pathway and brain-derived neurotrophic factor" *Behavioral Brain Research* 401(113066).
- Moreira, L.K.S. et al., (2023), "LQFM212, a piperazine derivative, exhibits potential antioxidant effect as well as ameliorates LPS-induced behavioral, inflammatory and oxidative changes" *Life Sciences* 312(121199).

Morris, A.A. et al. (2011), "Association between depression and inflammation--differences by race and sex: the META-Health study" *Psychosomatic Medicine* 73(6), pp. 462-468.

Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989), "Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties" *Annual Review of Immunology* 7, pp. 145-173.

Mravec, B. (2010), "The role of the vagus nerve in stroke" *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 158(1-2), pp. 8-12.

Müller, N., Ackenheil, M. (1998), "Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 22(1), pp. 1-33.

Murri, M.B. et al. (2016), "The HPA axis in bipolar disorder: systematic review and meta-analysis" *Psychoneuroendocrinology* 63, pp. 327-342.

Myint, A-M., Kim, Y-K. (2014), "Network beyond IDO in psychiatric disorders: Revisiting neurodegeneration hypothesis" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 48, pp. 304-313.

Nadal-Vicens, M., Chyung, J.H., Turner, T.J. (2014), "Farmacologia da neurotransmissão serotoninérgica e adrenérgica central" In: Golan, D.E. et al. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. 3ª ed., editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Nemeroff, C.B., Owens, M.J. (2002), "Treatment of mood disorders" *Nature Neuroscience* 5, pp. 1068-1070.

Nestler, E.J. et al. (2002), "Neurobiology of depression" *Neuron* 34(1), 13-25.

Neves, A.L.A. (2015), "Tratamento farmacológico da depressão", Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Neves, G. et al. (2013), "New insights into pharmacological profile of LASSBio-579, a multi-target N-phenylpiperazine derivative active on animal models of schizophrenia" *Behavioural Brain Research* 237, pp. 86-95.

Nicoletti, F. et al. (2010), "5-Androsterol ameliorates pleurisy, septic shock, and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice" *Autoimmune Diseases* 2010(757432), pp. 1-8.

Nishida, A. et al. (2002), "Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders" *International Immunopharmacology* 2(12), pp. 1619-1626.

Nutt, D. et al (2006), "Generalized anxiety disorder: a comorbid disease" *European Neuropsychopharmacology* 16(suppl 2), S109-S118.

O'Connor, J.C. et al. (2009), "Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice" *Molecular Psychiatry* 14(5), pp. 511–522.

O'Leary, O.F. et al. (2007), "Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test" *Psychopharmacology (Berl)* 192(3), pp. 357-371.

Ohgi, Y. et al. (2013), "Effects of antidepressants on alterations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 103(4), pp. 853-859.

Olivier, B., van Wijngaarden, I., Soudijn, W. (2000), "5-HT(3) receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review" *European Neuropsychopharmacology* 10(2), pp. 77-95.

Owens, M.J., Nemeroff, C.B. (1994), "Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter" *Clinical Chemistry* 40(2), pp. 288-295.
Owens, M.J. et al. (1997), "Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, pp. 1305-1322.

Oxenkrug, G.F. (2007), "Genetic and hormonal regulation of tryptophan-kynurenine metabolism" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1122, pp. 35-49.

Pace, T.W.W., Hu, F., Miller, A.H. (2007), "Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression" *Brain, Behavior, and Immunity* 21(1), pp. 9-19.

Palasz, E. et al. (2020), "BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's Disease" *International Journal of Molecular Sciences* 21(3), pp. 1170.

Papakostas, G.I. (2009), "Evidence for S-adenosyl-L-methionine (SAM-e) for the treatment of major depressive disorder" *Journal Clinical Psychiatry* 70(5), pp. 18-22.

Park, H.J. et al. (2015), "IL-4 inhibits IL-1 β -induced depressive-like behavior and central neurotransmitter alterations" *Mediators of Inflammation* 2015, 941413.

Patten, S.B. (2013), "Major depression epidemiology from a diathesis-stress conceptualization" *BMC psychiatry* 13(19), pp. 1-9.

Peng, X. et al. (2021), "Blood-brain barrier disruption by lipopolysaccharide and sepsis-associated encephalopathy" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11(768108).

Perry, V.H. (2004) "The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease" *Brain, Behavior, and Immunity* 18(5), pp. 407-413.

Pesarico, A.P. et al. (2014), "The antidepressant-like effect of 7-fluoro-1,3,5-tri-amine in the mouse forced swimming test is mediated by serotonergic and dopaminergic systems" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 54, pp. 179-186

Phillips, C. (2017), "Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection" *Neural Plasticity* 2017(7260130), pp. 1-17.

Piccinni, A. et al. (2008), "Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments" *Journal of Affective Disorders* 105(1-3), pp. 279-83.

Ponomarev, E.D. et al. (2007), "CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cell" *Journal of Neuroscience* 27(40), pp. 10714-10721.

Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977), "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants" *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 229(2), pp. 327-336.

Porsolt, R.D. (1978), "Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments" *European Journal of Pharmacology* 47(4), pp. 379-391.

Quevedo, J., Silva, A.G (2013), "Depressão: teoria e clínica", Editora: Artmed, Porto Alegre.

Ramos, A. (2008), "Animal models of anxiety: do I need multiple tests?" *Trends in Pharmacological Sciences* 29(10), pp. 493-498.

Ramos, A.G.B. et al. (2020), "Antiedematogenic and anti-inflammatory activity of the monoterpene isopulegol and its β -Cyclodextrin (β -CD) inclusion complex in animal inflammation models" *Foods* 14;9(5), pp. 630.

Ransohoff, R.M., Brown, M.A. (2012), "Innate immunity in the central nervous system" *Journal of Clinical Investigation* 122(4), pp. 1164-1171.

Reale, M. et al. (2006), "The acetylcholinesterase inhibitor, Donepezil, regulates a Th2 bias in Alzheimer's disease patients. *Neuropharmacology* 50, pp. 606-613.

Redrobe, J.P. et al. (1998), "Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity" *Psychopharmacology (Berl)* 138(1), pp. 1-8.

Reid, I.C., Stewart, C.A. (2001), "How antidepressants work: new perspectives on the pathophysiology of depressive disorder" *The British Journal of Psychiatry* 178, pp. 299-303.

Remus, J.L., Dantzer, R. (2016), "Inflammation models of depression in rodents: relevance to psychotropic drug discovery" *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19(9), pyw028.

Ressler, K.J., Mayberg, H.S. (2007), "Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic" *Nature Neuroscience* 10(9), pp. 1116-1124.

Riveros, ME et al. (2022), "Antioxidant biomolecules and their potential for the treatment of difficult-to-treat depression and conventional treatment-resistant depression" *Antioxidants (Basel)* 11(3), pp. 540.

Rodrigues, O.R.L. (2015), "Avaliação farmacológica no sistema nervosa central de um novo derivado piperazínico LQFM 104" Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiás.

Rodrigues-Neto, A.S.S. (2010), "Glutathione: envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas" Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Russo, S., Nestler, E (2013), "The brain reward circuitry in mood disorders" *Nature Reviews Neuroscience* 14, pp. 609-625.

Russo-Neustadt, A.A., Chen, M.J. (2005), "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity" *Current Pharmaceutical Design* 11(12), pp. 1495-1510.

Sahli, Z.T., Banerjee, P., Tarazi, F.I. (2016), "The preclinical and clinical effects of vilazodone for the treatment of major depressive disorder" *Expert Opinion on Drug Discovery* 11(5), pp. 515-523.

Saijo, K., Glass, C. (2011), "Microglial cell origin and phenotypes in health and disease" *Nature Reviews Immunology* 11, pp. 775-787

Saleh, T.S., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S. (1999), "Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan" *Peptides* 20(8), pp. 949-956.

Sanchez, C., Asin, K.E., Artigas, F. (2015), "Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data" *Pharmacology and Therapeutics* 145, pp. 43-57.

Santarsieri, D., Schwartz, T.L. (2015), "Antidepressant efficacy and side-effect burden: a quick guide for clinicians" *Drugs in Context* 4, 212290.

Santos, J.F.Q., Nakamura, E., Martin, D. (2007), "A compreensão da depressão na população pobre, uma ocorrência mais (fortemente) social do que uma doença (fracamente) clínica" *Mediações* 12(1), pp. 313-322.

Sato, H. et al. (2008), "Chronic buspirone treatment normalizes open field behavior in olfactory bulbectomized rats: assessment with a quantitative autoradiographic evaluation of the 5-HT_{1A} binding sites" *Brain Research Bulletin* 75(5), pp. 545-555.

Scapagnini, G. et al. (2012), "Antioxidants as antidepressants: fact or fiction?" *CNS Drugs* 26(6), pp. 477-490.

Schaefer, T. Jr (1963), "Early 'experience' and its effects on later behavioural process in rats. II. A critical factor in the early handling phenomenon" *Transactions of the New York Academy of Sciences* 25, pp. 871-889.

Sharma, N., Nehru, B. (2015), "Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: role of oxidative stress and neuroinflammation" *Neurochemistry International* 87, pp. 92-105.

Sedgwick, A.D. (1995), "Initiation of inflammatory response and its prevention" In: Bonta, I.L., Bray, M.A. Handbook of inflammation. Ed. Elsevier, New York.

Seibenhener, M.L., Wooten, M.C. (2015), "Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice" *Journal of Visualized Experiments* 96, e52434.

Shalev, I. et al. (2009), "BDNF Val66Met polymorphism is associated with HPA axis reactivity to psychological stress characterized by genotype and gender interactions" *Psychoneuroendocrinology* 34(3), pp. 382-388.

Sheline, Y.I., Gado, M.H., Kraemer, H.C. (2003), "Untreated depression and hippocampal volume loss" *American Journal of Psychiatry* 160(8), 1516-1518.

Shelton, R.C. et al. (2011), "Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression" *Molecular Psychiatry* 16(7), pp. 751-762.

Shimizu, E. et al. (2003), "Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants" *Biological Psychiatry* 54(1), pp. 70-75.

Shirayama, Y. et al. (2002), "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression" *Journal of Neuroscience* 22(8), pp. 3251-3261.

Sierra, A. et al. (2010), "Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis" *Cell Stem Cell* 7(4), pp. 483-495.

Silva, J.F.C. (2010), "Estresse ocupacional e suas principais causas e consequências", Monografia (Especialização em Gestão Empresarial) - Universidade Cândido Mendes, Rio de Janeiro.

Silva, R.M., Goulart, C.T., Guido, L.A (2018), "Evolução histórica do conceito de estresse" *Revista de Divulgação Científica Sena Aires* 7(2), pp. 148-156.

Silva, V.C, Giusti-paiva, A. (2015), "Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice" *Brain, Behavior, and Immunity* 45, pp. 109-117.

Siqueira, L.D. (2016), "Estudo dos mecanismos de déficit cognitivo associado ao envelhecimento: o papel da resposta inflamatória" Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Siskind, D. (2016), "First-and second-generation antipsychotics in treatment-refractory schizophrenia: systematic review and meta-analysis" *The British Journal of Psychiatry* 209(5), pp. 385-392.

Siwek, M. et al. (2013), "Oxidative stress markers in affective disorders" *Pharmacological Reports* 65(6), pp. 1558-1571.

Smaga, I. et al. (2015), "Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism" *Pharmacological Reports* 67(3), pp. 569-580.

Smiley, S.T., Grusby, M.J. (1998), "Interleukin 4" In: *Encyclopedia of Immunology* (Second Edition).

Song, J. et al. (2015), "Bipolar disorder and its relation to major psychiatric disorders: a family-based study in the Swedish population" *Bipolar Disorders*, 17(2), pp. 184-193.

Sousa, L.P. et al. (2010), "PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner" *Journal of Leukocyte Biology* 87(5), pp. 895-904.

Stanford, S.C. (2007), "The open field test: reinventing the wheel" *Journal of Psychopharmacology* 21(2), pp. 134-135.

Stone, E.A. et al. (2003), "Emerging evidence for a central epinephrine-innervated α 1-adrenergic system that regulates behavioral activation and is impaired in depression" *Neuropsychopharmacology* 28(8), pp. 1387-1399.

Stone, T.W., Perkins, M.N. (1981), "Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS" *European Journal of Pharmacology* 72(4), pp. 411–412.
Stryjer, R. et al. (2003), "Amantadine as augmentation therapy in the management of treatment-resistant depression" *International Clinical Psychopharmacology* 18(2), pp. 93-96.

Swiergiel, A.H., Dunn, A.J. (2007), "Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86(4), pp. 651-659.

Takahashi, K. et al. (2018), "Antidepressant-like effect of aripiprazole via 5-HT_{1A}, D₁, and D₂ receptors in the prefrontal cortex of olfactory bulbectomized mice" *Journal of Pharmacological Sciences* 137(3), pp. 241-247.

Taliaz, D. et al. (2010), "Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis" *Molecular Psychiatry* 15(1), pp. 80-92.

Tapia-Arancibia, L. et al. (2004), "Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function" *Frontiers in Neuroendocrinology* 25(2), pp. 77-107.

Teixeira, C.P. et al. (2013), "Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system" *Fundamental and Clinical Pharmacology* 27(2), pp. 129-137.

Teixeira-Silva, F. (2006), "Métodos para avaliar drogas antidepressivas" In: Almeida, R.N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Editora Guanabara Kooga, Rio de Janeiro.

Thierry, B. et al. (1984), "Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression?" *Behavioral and Neural Biology* 41(2), pp. 18018-9.

Tokita, K., Yamaji, T., Hashimoto, K. (2012), "Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression" *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 100(4), pp. 688-704.

Tracey, K.J. (2002), "The inflammatory reflex" *Nature* 420(6917), pp. 853-859.

Tundo, A. et al. (2022), "Efficacy and safety of 24-week pramipexole augmentation in patients with treatment resistant depression. A retrospective cohort study" *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 112(110425).

Tuin, A. et al. (2006), "On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver" *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 290(2), pp. G377-85.

Tyagi, E. et al (2008), "Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain" *Journal of Neuroimmunology* 205(1-2), pp. 51-56.

Ulloa, L. (2005), "The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway" *Nature Reviews Drug Discovery* 4, pp. 673-84.

Vaccarino, V. et al. (2008), "Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study" *Biological Psychiatry* 64(6), pp. 476-483.

Van den Oever M.C. et al. (2010), "Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(2), pp. 276-284.

Van Velzen, L.S. et al. (2017), "Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls" *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 76, pp. 140-144.

Vieira, T.O. et al. (2011), "Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger" *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(4), pp. 601-607.

Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L. (1973), "Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat" *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 143(3), pp. 711-714.

Vinet, J., et al. (2012), "Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity" *Journal of Neuroinflammation* 9(27).

Vismari, L.; Alves, G.J.; Palermo-Neto, J. (2008), "Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema" *Revista de Psiquiatria Clínica* 35(5), pp. 196-204.

Vogelzangs, N. et al. (2012), "Association of depressive disorders, depression characteristics and antidepressant medication with inflammation" *Translational Psychiatry* 2(2), e79.

Xu, T. et al. (2022), "The inhibition of LPS-induced oxidative stress and inflammatory responses is associated with the protective effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on bovine hepatocytes and murine liver" *Antioxidants (Basel)* 11(5), pp. 914.

Walker, A.K. et al. (2014), "Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression" *Pharmacological Reviews* 66(1), pp. 80-101.

Walsh, R.N., Cummins, R.A. (1976), "The open-field test: a critical review" *Psychological Bulletin* 83(3), pp. 482-504.

Wang, L.M. et al. (2018), "Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid-beta and p-tau formation in the rat brain" *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 8(2), pp. 86-99.

Wen, L.L. et al. (2007), "Rapid glia expression and release of proinflammatory cytokines in experimental *Klebsiella pneumoniae* meningoencephalitis" *Experimental Neurology* 205(1), pp. 270-278.

WHO; CU (2016) - World Health Organization and Columbia University, "Group Interpersonal Therapy (IPT) for Depression (WHO generic field-trial version 1.0)", Geneva, WHO.

WHO - World Health Organization (2017), "Depression and other common mental disorders: global health estimates", WHO.

WHO - World Health Organization (2021), "Depression", disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (Acessado 31 Janeiro 2022).

- Williams, N.G., Zhong, H., Minneman, K.P. (1998), "Differential coupling of alpha1-, alpha2-, and beta-adrenergic receptors to mitogen- activated protein kinase pathways and differentiation in transfected PC12 cells" *Journal of Biological Chemistry* 273(38), pp. 24624-24632.
- Wirleitner, B. et al. (2003), "Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: Immunologic and neuropsychiatric aspects" *Current Medicinal Chemistry* 10(16), 1581-1591.
- Yao, W. et al. (2016), "Role of Keap1-Nrf2 signaling in depression and dietary intake of glucoraphanin confers stress resilience in mice" *Scientific Reports* 6, (30659).
- Yao, W. et al. (2021), "Activation of BDNF by transcription factor Nrf2 contributes to antidepressant-like actions in rodents" *Translational Psychiatry* 11(1), 140.
- Yankelevitch-Yahav, R. et al. (2015), "The forced swim test as a model of depressive-like behavior" *Journal of Visualized Experiments* 97, e52587.
- Ye, L. et al. (2013), "IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase" *Journal of Neurochemistry* 125(6), pp. 897-908.
- Yirmiya, R. et al. (2001), "Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents" *Neuropsychopharmacology* 24(5), pp. 531-544.
- Yohn, C.N., Gergues, M.M., Samuels, B.A. (2017), "The role of 5-HT receptors in depression" *Molecular Brain* 10(28).
- Zafir, A., Ara, A., Banu, N. (2009), "In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action" *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33(2), pp. 220-208.
- Zhang, B. et al. (2019), "Antidepressant-like effect and mechanism of action of honokiol on the mouse lipopolysaccharide (LPS) depression model" *Molecules* 24(11), pp. 2035.
- Zhao, W.X. et al., (2017), "Acetaminophen attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment through antioxidant activity" *Journal of Neuroinflammation* 14(1), pp. 17.
- Zhao, J., et al. (2019), "Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice" *Scientific Reports* 9(1), pp. 5790.
- Zhu, C-B., Blakely, R.D., Hewlett, W.A. (2006), "The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters" *Neuropsychopharmacology* 31(10), pp. 2121-2131.
- Zhu, L. et al. (2014), "The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity" *Plos One* 9(5), pp. 1-14.

ANEXO I - Parecer da comissão de ética em uso de animais (CEUA) da UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Avaliação neurofarmacológica em modelos de ansiedade e depressão de derivados piperazínicos com substituinte BHT"**, registrada com o protocolo nº 118/19, sob a responsabilidade de **Elson Alves Costa e Lorrane Kelle da Silva Moreira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 16/03/2020 *ad referendum*.

- ☒ Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- ☒ Vigência da autorização (início e fim): 16/03/2020 a 31/12/2023
- ☒ Espécie/linhagem/raça: camundongo, *Swiss*
- ☒ Nº de animais autorizados: 440
- ☒ Peso/Idade: 30-35g/2 meses
- ☒ Sexo: machos
- ☒ Origem (fornecedor): Biotério Central da UFG

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@email.com

ANEXO II - Comprovante de aprovação da patente de LQFM212

20/07/2020 870200089750
12:06
29409161905405323

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 014720 0

Dados do Depositante (71)**Depositante 1 de 1**

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Tipo da Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 01567601000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: UFG, PRÉDIO DA REITORIA, CAMPUS SAMAMBAIA

Cidade: Goiânia

Estado: GO

CEP: 74690-900

País: Brasil

Telefone: (62)3521 2043

Fax: (62)3521 2023

Email: dpitt.ufg@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/07/2020 às 12:06, Petição 870200089750

ANEXO III - Artigo publicado com parte dos resultados referentes a tese

Behavioural Brain Research 401 (2021) 113066

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Potential antidepressant-like effect of piperazine derivative LQFM212 in mice: Role of monoaminergic pathway and brain-derived neurotrophic factor

Lorrane Kelle da Silva Moreira^a, Adriane Ferreira de Brito^a, Dayane Moreira da Silva^a, Lorrayne Siqueira^b, Daiany Priscilla Bueno da Silva^a, Carina Sofia Cardoso^a, Izziara Ferreira Florentino^a, Pablinny Moreira Galdino de Carvalho^c, Paulo César Ghedini^d, Ricardo Menegatti^b, Elson Alves Costa^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology of Natural and Synthetic Products, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil
^b Laboratory of Medicinal Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil
^c Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, Barreiras, BA, Brazil
^d Biochemical and Molecular Pharmacology Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Depression
 Monoamines
 BDNF
 Preclinical screening

ABSTRACT

Major depression disorder (MDD) is one of the most widespread and debilitating psychiatric diseases and may be associated with other mental disorders such as anxiety. Despite advances in neurobiology studies, currently no established mechanism can explain all facets of MDD, and available drugs often show therapeutic delay for clinical effectiveness and response rates in patients are around 50 %. Previous activities of piperazine derivatives on CNS are indicators of its therapeutic potential for treating mental disorders. In this regard, we have previously shown that the piperazine derivative 2,6-di-tert-butyl-4-((4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol (LQFM212) has anxiolytic-like activity which involves serotonergic pathway, nicotinic receptors and BZD-site of GABA_A receptor, without cognitive impairments. Herein, was evaluated the potential antidepressant-like effect of LQFM212 on forced swimming test (FST) after a single dose of 54 µmol/kg and after repeated treatment for 15 days in mice. Pretreatment with WAY-100635, PCPA, prazosin, SCH-23390, sulpiride or AMPT reversed the antidepressant-like effect on FST, suggesting that monoaminergic pathway contributes for effects of LQFM212. Furthermore, repeated treatment with LQFM212 increased hippocampal BDNF levels dosed by ELISA kit. In assessment of possible adverse effects, repeated treatment with LQFM212 did not alter the body weight of the animals, glutathione levels in the liver, and serum levels of AST, ALT, urea, and creatinine. Taken together, the results showed that LQFM212 has an antidepressant-like effect that involves monoaminergic pathway and increased BDNF levels. This compound represents promising candidate for prototype of psychoactive drugs for treatment of anxiety and depression disorders since these pathological conditions may exist in comorbidities.

1. Introduction

Major depression disorder (MDD) is one of the most widespread and debilitating psychiatric illnesses, leading to tremendous individual and socioeconomic burden [1]. The most typical symptoms of MDD are depressed mood, diminished interests, impaired cognitive function and vegetative symptoms, such as disturbed sleep or appetite, and in its most severe form, MDD increases the risk of suicide and may be associated with other mental disorders such as anxiety [2,3]. Despite advances in neurobiology studies, currently no established mechanism can explain all facets of the disease. However, MDD is associated with alterations in regional brain volumes, particularly the hippocampus, as well as changes in either activation or connectivity of neural networks, e.g. neuroendocrine axis, neurotrophic factors, and monoaminergic pathways [2].

In the treatment of MDD, there are two main initial approaches,

* Corresponding author at: Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos, ICB-2, Sala 209, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, CP 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brazil.
 E-mail address: elco@ufg.br (E.A. Costa).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113066>

Received 31 July 2020; Received in revised form 20 November 2020; Accepted 9 December 2020
 Available online 14 December 2020
 0166-4328/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO IV - Artigo publicado com parte dos resultados referentes a tese

Life Sciences 312 (2023) 121199

Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifeasci

LQFM212, a piperazine derivative, exhibits potential antioxidant effect as well as ameliorates LPS-induced behavioral, inflammatory and oxidative changes

Lorrane Kelle da Silva Moreira^a, Larissa Córdova Turones^a, Hericles Mesquita Campos^b, Aline Martins Nazareth^a, Douglas Viciira Thomaz^c, Eric de Souza Gil^c, Paulo César Ghedini^b, Fábio Fagundes da Rocha^d, Ricardo Menegatti^c, James Oluwagbamigbe Fajemiroye^a, Elson Alves Costa^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology of Natural and Synthetic Products, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil
^b Laboratory of Biochemical and Molecular Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil
^c Laboratory of Medicinal Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil
^d Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Neuroinflammation
 Oxidative stress
 Cytokines
 Depressive behavior

ABSTRACT

Aims: Oxidative stress, impaired antioxidant defense and neuroinflammation are often associated with the onset and progression of neuropsychiatric diseases. Conversely, several piperazine compounds presents beneficial neuropharmacological effects as well as antioxidant activity, and some derivatives combine both activities. LQFM212 (2,6-di-*tert*-butyl-4-((4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) was synthesized to produce effects on CNS and to have an additional antioxidant effect. Previous preclinical tests have been shown anxiolytic- and antidepressant-like effects of LQFM212 in mice. Herein, the main objective was to verify the possible antioxidant potential and the effects of LQFM212 against behavioral changes, inflammatory and oxidative markers induced by lipopolysaccharide (LPS).

Main methods: Initially, antioxidant potential of LQFM212 was evaluated by electrochemical assays. Afterwards, the effects of oral treatment with LQFM212 were evaluated in mice using LPS-induced models of systemic or local inflammation.

Key findings: In LPS-induced neuroinflammation, LQFM212 treatment reverted changes caused by LPS, demonstrated by attenuated anxiogenic- and depressive-like behaviors, reduced pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and increased anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) on serum, and also improved oxidative stress-related changes (levels of nitrite, malondialdehyde, glutathione and carbonylated protein, and superoxide dismutase, catalase, myeloperoxidase and cholinesterase activities) on brain cortex and hippocampus. However, LQFM212 treatment did not attenuate the inflammatory changes in LPS-induced pleurisy model.

Significance: LQFM212 presents antioxidant activity and ameliorates behavioral, inflammatory and oxidative changes after LPS-induced neuroinflammation model. These effects do not seem to be secondary to a peripheral anti-inflammatory action of LQFM212, since this compound failed to attenuate the inflammatory changes in LPS-induced pleurisy model.

1. Introduction

Excessive reactive oxygen and nitrogen species (RONs) and impaired antioxidant defense system generate an oxidative stress state, leading to

molecular damage in cellular structures and has been associated with the onset and progression of neuropsychiatric diseases such as schizophrenia, bipolar mood disorder, anxiety, and depression [1]. Besides, inflammatory reactions on central nervous system (CNS), also called

* Corresponding author at: Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais - ICB-2, Sala 209, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, CP 131, CEP 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.
 E-mail address: elcoo@ufg.br (E.A. Costa).

<https://doi.org/10.1016/j.life.2022.121199>

Received 20 September 2022; Received in revised form 11 November 2022; Accepted 12 November 2022

Available online 17 November 2022

0024-3205/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO V - Artigo publicado com resultados paralelos ao doutorado

Behavioural Brain Research 417 (2022) 113582

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Anxiolytic- and antidepressant-like effects of new phenylpiperazine derivative LQFM005 and its hydroxylated metabolite in mice

Lorrane Kelle da Silva Moreira^{a,*}, Rafaela Ribeiro Silva^b, Dayane Moreira da Silva^a, Mirella Andrade Silva Mendes^c, Adriane Ferreira de Brito^a, Flávio Souza de Carvalho^c, Germán Sanz^d, Marcella Ferreira Rodrigues^d, Artur Christian Garcia da Silva^f, Douglas Vieira Thomaz^c, Valéria de Oliveira^c, Bonick Gontijo Vaz^d, Luciano Moraes Lião^e, Marize Campos Valadares^f, Eric de Souza Gil^e, Elson Alves Costa^a, François Noël^b, Ricardo Menegatti^c

^a Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

^b Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Laboratório de Química Farmacológica Medicinal (LQFM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^d Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas - LaCEM, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

^e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

^f Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia in vitro (Tuto), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Anxiety
Depression
Piperazine ring
5-HT_{1A}
Central nervous system disorders

ABSTRACT

The current treatments available for anxiety and depression are only palliative. Full remission has remained elusive, characterizing unmet medical needs. In the scope of an academic drug discovery program, we describe here the design, synthesis, in vitro metabolism prediction and pharmacological characterization of a new piperazine compound, 1-(4-methoxyphenyl)-4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazine (LQFM005), and of its main putative metabolite, 4-(4-((4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)-1H-pyrazol-1-yl)phenol (LQFM235). The production of the metabolite was initially performed by in vitro biotransformation of LQFM005 using *Aspergillus nidulans* and then by chemical synthesis. Oral administration of either 12 or 24 µmol/kg LQFM005 to mice did not affect spontaneous locomotor activity but increased the time spent in the center of the open field. Both LQFM005 and LQFM235 (24 µmol/kg) increased the time spent by the mice in the open arms of the elevated plus maze (EPM), a good indication of anxiolytic-like effect, and decreased the immobility time in the forced swimming test (FST), suggesting an antidepressant-like effect. The previous administration of WAY-100635 (a 5-HT_{1A} antagonist) abolished the effects of LQFM005 in both EPM and FST. Binding experiments showed that LQFM005 and its metabolite bind to the 5-HT_{1A} receptor with a moderate affinity (K_i around 5–9 µM). The two compounds are relatively safe, as indicated by cytotoxic assessment using the 3T3 fibroblast cell line and estimated LD₅₀ around 600 mg/kg. In conclusion, oral administration of the newly synthesized phenylpiperazines produced anxiolytic- and antidepressant-like effects in behavioral tests, putatively in part through the activation of 5-HT_{1A} receptors.

1. Introduction

The prevalence of depression disorders has increased since 1990 due to ageing and population growth [1]. Today, the first line antidepressants are the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) but they are not fully satisfactory since they are ineffective in many patients, have a slow onset of action and often cause side effects that reduced the compliance [2]. SSRIs are also first long-term treatment line for the treatment of generalized anxiety disorder. Neither the underlying pathophysiology of these mood disorders nor the mechanism of action of

* Correspondence to: Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais - ICB-2, Sala 209, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, CP 131, CEP 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.
E-mail address: lorranekelle22@hotmail.com (L.K.S. Moreira).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113582>

Received 18 June 2021; Received in revised form 26 August 2021; Accepted 10 September 2021

Available online 15 September 2021

0166-4328/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.