



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**NOVOS AVANÇOS NA COMPREENSÃO DO MECANISMO DE AÇÃO
ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA A E DE SEU POTENCIAL EFEITO
ANALGÉSICO**

RAPHAELA GONÇALVES BARROS PERRI

RIBEIRÃO PRETO - SP
2023

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**NOVOS AVANÇOS NA COMPREENSÃO DO MECANISMO DE AÇÃO
ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA A E DE SEU POTENCIAL EFEITO
ANALGÉSICO**

RAPHAELA GONÇALVES BARROS PERRI

Orientador: Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de Neurociências.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

P456n PERRI, Raphaela Gonçalves Barros, 2001-
Novos avanços na compreensão do mecanismo de ação
antidepressivo da Riparina A e de seu potencial efeito analgésico /
Raphaela Gonçalves Barros Perri. – Ribeirão Preto, 2023.
60 f. : il.

Orientador: Prof.º Dr.º Renê de Oliveira Beleboni.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Doutorado em Biotecnologia, 2023.

1. Depressão. 2. Neurofarmacologia. 3. Analgésicos – Efeitos. 4.
Antidepressivos. II. Título.

CDD 615.1

RAPHAELA GONÇALVES BARROS PERRI

**NOVOS AVANÇOS NA COMPREENSÃO DO MECANISMO DE AÇÃO
ANTIDEPRESSIVO DA RIPARINA A E DE SEU POTENCIAL EFEITO
ANALGÉSICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia aplicada à saúde.

Área de Concentração: Doutorado em Biotecnologia aplicada à saúde

Data da defesa: 20 de outubro de 2023

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **RENE DE OLIVEIRA BELEBONI**
Data: 20/10/2023 16:18:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni
Presidente/Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **ERICA APARECIDA GELFUSO ROSSETTE**
Data: 26/10/2023 19:51:40-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Erica Aparecida Gelfuso Rosetti
Universidade de Rennes

Documento assinado digitalmente
 **JOSE LUIZ LIBERATO**
Data: 26/10/2023 10:36:41-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. José Luís Liberato
Universidade de São Paulo – USP

Documento assinado digitalmente
 **MOZART DE AZEVEDO MARINS**
Data: 21/10/2023 05:35:41-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **ANA LUCIA FACHIN SALTORATTO**
Data: 24/10/2023 17:22:47-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2023

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por ter permitido a concretização desta etapa.

À minha mãe Adnalva Gonçalves Silva Barros pelo bom exemplo, amor, dedicação com que fui criada, pelos valores com os quais amadureci. Sem seu apoio nada seria possível.

Ao meu pai Wagner Feliciano de Barros, que não está mais presente entre nós, mas que onde estiver está acompanhando cada passo meu. Com certeza foi a minha inspiração para seguir nos estudos, graças a ele o meu amor pela ciência foi despertado. Obrigada por tudo, meu eterno e amado pai.

À minha irmã Táschia Nathalia pelo amor e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni, por ter acreditado e confiado em mim para realização desse projeto.

Aos meus alunos de iniciação científica Júlia, Matheus e Marina que me ajudaram na execução dos experimentos, pelo convívio, pela amizade e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos Professores da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, que contribuíram para minha formação.

Aos Técnicos dos laboratórios, pelo suporte e ajuda.

A UNAERP, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos animais pela eutanásia.

RESUMO

A Riparina A é um novo composto sintético e um análogo químico das três principais riparinas naturais conhecidas (Riparinas I, II e III), sendo, portanto, uma estrutura representativa/homóloga das demais que se sabe exercerem atividade ansiolítica e antidepressiva. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou pela primeira vez que, ao contrário de suas contrapartes naturais, a Riparina A não tem um efeito ansiolítico significativo, mas, por outro lado, tem um forte efeito antidepressivo em diferentes modelos animais de depressão. Com base nisso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da Riparina A na regulação gênica e proteica dos níveis de *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF) e subunidade GluN2B do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), genes estes envolvidos no quadro de depressão e no curso de seu tratamento, bem como, avaliar o efeito da Riparina A nos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias também envolvidas na doença. Para realização do estudo, foi utilizado o modelo *chronic unpredictable mild stress* (CUMS) para indução do quadro depressivo. Após a finalização do protocolo CUMS, os animais foram eutanasiados e dissecados para remoção das estruturas cerebrais (córtex e hipocampo), seguindo com a avaliação dos níveis de BDNF, VEGF e NR2B por RT-PCR e Western Blot, sendo realizado em sequência os testes de Elisa para avaliar o conteúdo de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 nestas mesmas áreas cerebrais. Neste trabalho, a Riparina A teve também seu potencial efeito analgésico investigado através de modelos animais validados (testes da contorção abdominal, retirada da cauda e o teste de plantar). A análise estatística mostrou que a Riparina A promove a regulação positiva dos genes BDNF, VEGF e a regulação negativa de GluN2B, o que parcialmente explica o seu efeito antidepressivo. Nas análises dos níveis de interleucinas, o tratamento com Riparina A promoveu diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e aumentou os níveis daquelas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, o que mais uma vez condiz com seu efeito antidepressivo. Na avaliação da atividade analgésica, foi observado que o tratamento reduziu o número de contorções abdominais e promoveu aumento no tempo de latência para a resposta ao estímulo térmico nos testes de retirada da cauda e de plantar, demonstrando moderada atividade analgésica para a Riparina A. O trabalho apresenta diferentes abordagens experimentais, incluindo técnicas neuroetológicas, neuroquímicas e de biologia molecular, sendo assim, um trabalho que colabora na elucidação dos mecanismos de ação dessa droga. Os resultados promissores apresentados reforçam o potencial da Riparina A como droga de grande interesse médico-farmacêutico.

Palavras-chave: Riparina A; CUMS; Depressão; Neuroetologia; Neurofarmacologia

ABSTRACT

Riparin A is a new synthetic compound and a chemical analog of the three main known natural riparins (Riparins I, II and III), and is therefore a representative/homologous structure of the others known to exert anxiolytic and antidepressant activity. Recently, our research group demonstrated for the first time that, unlike its natural counterparts, Riparin A does not have a significant anxiolytic effect but, on the other hand, has a strong antidepressant effect in different animal models of depression. Based on this, the present work aimed to evaluate the effect of Riparin A on gene and protein regulation of the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and the GluN2B subunit of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, genes involved in depression and the course of its treatment, as well as to evaluate the effect of Riparin A on the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines also involved in the disease. The study used the chronic unpredictable mild stress (CUMS) model to induce depression. After completion of the CUMS protocol, the animals were euthanized and dissected to remove the structures (cortex and hippocampus), followed by assessment of BDNF, VEGF and NR2B levels by RT-PCR and Western Blot, followed by Elisa tests to assess the content of TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 in these same brain areas. In this study, Riparin A's potential analgesic effect was also investigated using validated animal models (abdominal writhing tests, tail withdrawal and the plantar test). Statistical analysis showed that Riparin A promotes the positive regulation of the BDNF and VEGF genes and downregulation of GluN2B, which partially explains its anti-depressant effect. In the analysis of interleukin levels, treatment with Riparin A promoted a decrease in the levels of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and an increase in the levels of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, which is once again consistent with its antidepressant effect. In the evaluation of analgesic activity, it was observed that the treatment reduced the number of abdominal contortions and promoted an increase in the latency time for the response to the thermal stimulus in the tail withdrawal and plantar tests, demonstrating moderate analgesic activity for Riparin A. The work presents different experimental approaches, including neuroethological, neurochemical and molecular biology techniques, thus contributing to the elucidation of the mechanisms of action of this drug. The promising results presented reinforce the potential of Riparin A as a drug of great medical and pharmaceutical interest.

Keywords: Riparin A; CUMS; Depression; Neuroethology; Neuropharmacology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Semelhança estrutural entre os diferentes tipos de riparinas.....	14
Figura 2 – Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	22
Figura 3 – Teste de retirada da cauda.....	23
Figura 4 - Teste de plantar.....	24
Figura 5 - Expressão gênica relativa do gene BDNF hipocampo.....	25
Figura 6 - Expressão gênica relativa do gene BDNF córtex.....	26
Figura 7 - Expressão gênica relativa do gene GluN2B hipocampo.....	26
Figura 8 - Expressão gênica relativa do gene GluN2B córtex.....	27
Figura 9 - Expressão gênica relativa do gene VEGF hipocampo.....	28
Figura 10 - Expressão gênica relativa do gene VEGF córtex.....	29
Figura 11 - Expressão gênica da proteína BDNF hipocampo e córtex	30
Figura 12 - Expressão gênica da proteína GluN2B hipocampo e córtex.....	31
Figura 13 - Mensuração dos níveis de TNF- α hipocampo.....	33
Figura 14 - Mensuração dos níveis de TNF- α córtex.....	34
Figura 15 - Mensuração dos níveis de IL-1 β hipocampo.....	34
Figura 16 - Mensuração dos níveis de IL-1 β córtex.....	35
Figura 17 - Mensuração dos níveis de IL-4 hipocampo.....	36
Figura 18 - Mensuração dos níveis de IL-4 córtex.....	37
Figura 19 - Mensuração dos níveis de IL-6 hipocampo.....	37
Figura 20 - Mensuração dos níveis de IL-6 córtex.....	38
Figura 21 - Mensuração dos níveis de IL-10 hipocampo.....	38
Figura 22 - Mensuração dos níveis de IL-10 córtex.....	39
Figura 23 - Mensuração dos níveis de IL-13 hipocampo.....	40
Figura 24 - Mensuração dos níveis de IL-13 córtex.....	40
Figura 25 - Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	41
Figura 26 - Tempo de latência avaliação teste de retirada da cauda.....	43
Figura 27 - Tempo de latência avaliação teste de plantar.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cronograma do procedimento CUMS.....	17
Tabela 2 - “Primers” que serão utilizados para o RT-PCR.....	19
Tabela 3 - Influência do pré-tratamento com o composto riparina no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	41
Tabela 4: Influência do pré-tratamento com o composto riparina sob o período de latência ao estímulo térmico nociceptivo, no teste de retirada da cauda.....	43
Tabela 5: Influência do pré-tratamento com o composto riparina sob o período de latência ao estímulo térmico, no teste de plantar.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Cloridrato de Fluoxetina

AAS – Ácido acetilsalicílico

BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*

BSA - Albumina bovina sérica

Ca²⁺ - Cálcio

CN - Controle negativo

CUMS - Unpredictable mild stress

DM - Depressão maior

GluN2B - Subunidade do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA)

i.p. - Intraperitoneal

IL - Interleucina

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

K⁺ - Potássio

Mg - Miligrama

mg/kg - Miligrama por quilo

min - Minuto(s)

mL - Mililitro

mL/kg - Mililitro por quilograma

mm - Milímetro

Na⁺ - Sódio

PA - Potencial anticonceptivo

RIP - RIPARINA A

RPM - Rotação por minuto

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

VEGF - *vascular endothelial growth factor*

μ g/kg - Micrograma por quilograma

μ L – Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO GERAL.....	15
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Fármacos e Reagentes.....	16
3.2. Animais.....	16
3.3. Protocolo do <i>Chronic Unpredictable Mild Stress</i> (CUMS).....	17
3.4. Ensaio Bioquímicos.....	18
3.4.1. Dissecção Hipocampal.....	18
3.5. Quantificação mRNA – RT-PCR.....	18
3.6. Quantificação da proteína – Western Blot.....	19
3.7. Avaliação dos níveis de citocinas - ELISA.....	21
3.8. Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....	22
3.8.1. Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético.....	22
3.8.2. Teste de <i>Tail Flick</i>	22
3.8.3. Teste de <i>Hargreaves</i>	23
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE RNAm POR RT-PCR.....	24
4.1.2. Expressão gênica de RNAm-BDNF em animais submetidos ao CUMS.....	24
4.1.3. Expressão gênica de RNAm-GluN2B em animais submetidos ao CUMS.....	26
5.1.3. Expressão gênica de RNAm-VEGF em animais submetidos ao CUMS.....	27
5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT.....	29
5.2.1. Expressão gênica da proteína BDNF em animais submetidos ao CUMS.....	29
5.2.2. Expressão gênica da proteína Glun2B em animais submetidos ao CUMS.....	30
5.2.3. Expressão gênica da proteína VEGF em animais submetidos ao CUMS.....	32
6. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS.....	33
6.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	42
5.4.1. Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético.....	42
5.4.2. Teste de <i>Tail-Flick</i>	43
6.1.3. Teste de <i>Hargreaves</i>	45
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS.....	47

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

1. INTRODUÇÃO

A depressão maior (DM) é uma doença psiquiátrica grave, de curso crônico e recorrente que pode afetar todas as classes sociais, ocasionando relevante impacto social e econômico. Mundialmente, são mais de 300 milhões de pessoas afetadas, sendo uma das principais causas de morte e de incapacitação em todo o mundo. A doença causa sofrimento, reduz a produtividade no trabalho, no âmbito escolar e traz problemas familiares, além de uma maior utilização dos serviços públicos e privados de saúde.

Aproximadamente, cerca de 800 mil pessoas morrem por suicídio a cada ano, devido ao quadro depressivo associado (BÉTRY et al., 2015; WHO, 2022). O suicídio já representa 1,4% de todas as mortes ao redor do mundo, ocorrendo com mais frequência entre os jovens de 15 até 30 anos, sendo a segunda principal causa de morte nessa faixa etária (WHO, 2022). Segundo dados do DataSUS, as mortes por lesão autoprovocada entre 2011 e 2020 aumentaram 35%. Só em 2020 foram registrados 12.895 suicídios no Brasil (DATASUS, 2022). Dentre as doenças psiquiátricas, a depressão é a mais evidenciada e associada ao quadro de suicídio, ficando claro a magnitude da problemática em questão e de sua importância para a saúde pública (BERTOLOTE & FLEISCHMANN, 2002; BOTEGA, 2014).

A depressão pode afetar todas as faixas etárias e ambos os sexos, porém a incidência é maior no sexo feminino, sendo duas a três vezes mais frequente quando comparada com incidência no sexo masculino (TENG & DEMÉTRIO, 2012; WHO, 2021). Recentemente, e com a pandemia, o percentual de pessoas com depressão saltou de 4,2% para 8,0%, enquanto os casos de ansiedade foram de 8,7% para 14,9% (UERJ, 2020). Dentre os diferentes países, o Brasil possui uma situação mais delicada, uma vez que lidera o ranking mundial de prevalência de transtornos de ansiedade e ocupa a quinta posição de pessoas com depressão (WHO, 2022, SOUZA & MACHADO-DE-SOUSA, 2017).

É muito importante ressaltar que a depressão é um quadro complexo e que segundo a OMS: “Está muito além de um estado melancólico”. A depressão difere das flutuações regulares de humor normais e corriqueiras, como “o estar triste/aborrecido ocasionalmente” (NESTLER et al., 2002). Trata-se de uma doença mental em que o indivíduo tem uma baixa no humor de maneira persistente e grave, apatia e sentimento de culpa, em alguns casos cometendo violência interpessoal/autoprovocada (WHO, 2021).

Apesar de existirem várias terapias com medicamentos e tratamentos psicológicos para a depressão, 10% a 30% das pessoas não apresentam melhora depois do início do tratamento, apresentando um quadro de resistência aos medicamentos. Além disso, efeitos colaterais como alterações de ordem motora, disfunção cognitiva, prejuízos da libido e alterações de peso e sono, dentre outros, podem facilmente ocorrer com o tratamento convencional (LARSEN, 2018). Devido a severidade dos efeitos colaterais e demora/ausência no resultado terapêutico, cerca de 14,9% dos pacientes acabam abandonando o tratamento, o que se mostra um grave problema de adesão terapêutica (VIGO et al., 2016; WHO, 2022). De fato, por mais que existam fármacos eficazes, uma grande parte dos pacientes apresenta resistência a medicação, somando os diversos efeitos colaterais que apresentam (ataxia, amnésia, sudorese, boca seca, sedação, aumento de peso e diminuição da libido) (FAJEMIROYE et al., 2016). Dessa forma se faz necessário aprimoramento nas formas de tratamentos convencionais, como também do surgimento de novas abordagens terapêuticas.

Não obstante, e apesar da evolução nas pesquisas sobre etiologia e fisiopatologia, melhoras na intervenção terapêutica na depressão têm sido limitadas, o que significa maior necessidade de investimentos e esforços para busca de alternativas que possam melhorar o prognóstico dos casos (BALDESSARINI et al., 2015). Com o aumento de 20% na última década, essa patologia tem despertado o interesse na busca por soluções terapêuticas bem fundamentadas, já que a doença tende a se tornar a mais incapacitante no mundo (OMS, 2022).

Mesmo após tantos avanços na ciência, a causa da depressão continua sem uma definição/posição definitiva, o que dificulta aperfeiçoar a forma de tratamento. Até então a disfunção na neurotransmissão monoaminérgica é uma das teorias mais estudadas e aceitas (PRINS; OLIVER; KORTE, 2011), assim como a relação do eixo hipotalâmico hipofisário-adrenal (eHHA) com a depressão (ANACKER et al., 2011), do ciclo circadiano (MCCLUNG, 2007) e os processos neuroimunológicos (MILLER, 2010; HASSAMAL S, 2023). De fato, de acordo Vismari e colaboradores (2008), por mais de três décadas, as bases biológicas dos transtornos depressivos tem seio na hipótese monoaminérgica da depressão. A teoria propõe que a depressão seja desencadeada pelo déficit na disponibilidade sináptica de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (RANG et al., 2012). principalmente na região do córtex pré-frontal e hipocampo (DREVETS; PRICE; FUREY, 2008). O mecanismo de ação dos antidepressivos são coadunam com essa teoria, uma vez que inibem de modo

seletivo ou não a recepção sináptica monoaminas e/ou inibem o seu catabolismo, aumentando desta forma os níveis de neurotransmissores sinápticos envolvidos no processo (RANG et al., 2012).

A teoria monoaminérgica é a hipótese mais aceita atualmente, todavia, essa teoria por si só é bastante limitada ao explicar a complexidade da depressão, sua evolução e tratamento. A depressão é muito mais complexa e se só essa teoria monoaminérgica fosse suficiente, um tratamento que aumentasse a quantidade de serotonina, dopamina e/ou noradrenalina seria obrigatoriamente suficiente para o cessar da depressão ou para causar a sua remissão em tempo mais breve. Assim, outros eventos ou mecanismos ou sistemas de neurotransmissão e de sinalização celular devem estar envolvidos na doença e no seu prognóstico, incluindo as explicações que tratam de sua remissão ao ser acertado um tratamento efetivo para um dado paciente. Dentro disso, algumas teorias como a das neurotrofinas, por exemplo, tem ganhado expressão. De fato, o gene para o BDNF e os seus níveis parecem sofrer *Downregulation* no hipocampo e córtex pré-frontal medial de pessoas com depressão (PHILLIPS, 2017). Diante disso, alguns estudos sugerem que os níveis e função alterada de BDNF possam contribuir para a desarranjos sinápticos importantes que cursam com a depressão, ao mesmo tempo que o aumento dos níveis desta neurotrofina em áreas específicas do cérebro possa facilitar a plasticidade e a remodelação sinápticas, promovendo o alívio dos sintomas depressivos e a remissão da doença quando de um tratamento efetivo (DUMAN, 2014; PHILLIPS, 2017).

Além do BDNF, o VEGF também foi observado como regulado negativamente no hipocampo de modelos animais de depressão e teve sua expressão aumentada por exercícios e tratamento efetivo com antidepressivos (JIANG et al., 2018). Além do BDNF e VEGF, outro gene que tem recebido destaque dentro dessa patologia é o GluN2B. Alguns artigos mostram que o uso de antagonistas do GluN2B é suficientemente efetivo para evocar uma resposta antidepressiva em modelos animais de depressão (JIMÉNEZ et al., 2014).

As neurotrofinas, individual ou coletivamente, fazem parte da dinâmica cerebral normal, atuando na remodelagem e plasticidade neuronal, no desenvolvimento, maturação e diferenciação de novos neurônios, o que é salutar para vários eventos cerebrais, incluindo a cognição e a regulação do humor (ABDOLAHY et al., 2022).

Além da importância de avaliar esses genes e suas proteínas correlacionadas, algumas citocinas têm recebido destaque dentro do quadro clínico da depressão e algumas têm sido estudadas como possíveis biomarcadores para essa doença, como a IL1 β e IL10 (MILLER, MALETIC, RAISON, 2009; MILLER & RAISON, 2016; PAPE et al., 2019). As citocinas estão envolvidas em muitos aspectos relacionados a fisiopatologia da depressão, incluindo o metabolismo de neurotransmissores, a função neuroendócrina, a neurogênese, a integridade neuronal, a remodelação sináptica e a plasticidade neural. Em alguns desses estudos foi demonstrado que a administração de IL-10, IL-13, IL-1 leva a melhora e recuperação do quadro depressivo em modelos animais (GOSHEN, YIRMIYA, 2007; KOO JW, DUMAN, 2008; GOSHEN, YIRMIYA, 2009). Sendo assim, o estudo dessas citocinas nos modelos de depressão em animais tem um potencial muito grande para compreensão da fisiopatologia da depressão e de seu tratamento.

Como salientado anteriormente, apesar de haver uma gama enorme de fármacos antidepressivos no mercado, a maioria destes fármacos exigem em média 20-30 dias para iniciarem a melhora dos sintomas de depressão quando adequadamente selecionados para o paciente e na sua dosagem correta, o que nem sempre é fácil de se conseguir. Essa demora de ação não pode ser explicada apenas com base na teoria das monoaminas, tendo em vista a inibição da sua recaptação ou catabolismo por fármaco ser imediata e sustentada (GOVONI et al., 2001). Assim, uma explicação para o atraso no início da ação antidepressiva deve envolver outros mecanismos paralelos ou além do envolvimento da serotonina, dopamina e noradrenalina. Isto pode incluir alterações sinápticas adaptativas, o que deve envolver a cascata de sinalização intracelular de neurônios específicos, a modulação da expressão de genes e participação de fatores neurotróficos ou neurotrofinas na plasticidade e remodelagem sináptica em regiões importantes como o hipocampo e córtex medial (YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017). Com efeito, o estudo de outros mecanismos que possam estar envolvidos no quadro depressivo e no seu tratamento, como o estudo da participação das neurotrofinas e citocinas é de grande relevância médica.

Além disso, os efeitos colaterais (alterações de ordem motora, disfunção cognitiva, de peso, libido e sono, dentre outros) são comuns para muitos dos fármacos antidepressivos convencionais e, em muitos casos, estes efeitos colaterais se sobrepõem os benefícios terapêuticos (BAUNE; BRIGNONE; LARSEN, 2018). Novos fármacos foram desenvolvidos, mas ainda são observados efeitos colaterais e demora no

aparecimento do efeito terapêutico (FAVA; OFFIDANI, 2011). Diante dessa problemática, 65% dos pacientes que fazem o uso dos fármacos por um longo período de tempo não conseguem melhora completa dos sintomas, e 14,9% destes pacientes acabam desistindo do tratamento, o que implica em baixa adesão terapêutica (SERNA et al., 2015) e (AL-HARBI, 2012; BALDESSARINI et al., 2015). Assim, há ainda um grande número de pacientes que não tem uma boa resposta ao tratamento antidepressivo tradicional, sendo extremamente relevante pesquisas nessa área a fim de buscar novas abordagens terapêuticas com ação mais efetiva e rápida, com maior adesão do paciente ao tratamento e menor quantidade de efeitos colaterais (FAJEMIROYE et al., 2016).

Com a busca por melhores abordagens terapêuticas para depressão, pesquisadores têm aplicado seus esforços na busca de compostos naturais com potencial antidepressivo e que possam apresentar menos efeitos colaterais. Compostos à base de plantas cada vez mais têm despertado o interesse na clínica para várias doenças, uma vez que, muitas pessoas procuram esse tipo de tratamento por terem, em tese, menores efeitos adversos. Há também muitos compostos importantes que atuam sobre o sistema nervoso central que foram isolados de espécies de plantas e alguns deles são usados clinicamente para vários distúrbios, incluindo ansiedade e depressão (FAJEMIROYE et al., 2016).

De fato, algumas plantas possuem compostos com ação no sistema nervoso central (SNC) promovendo efeitos anticonvulsivantes, ansiolíticos e antidepressivos (BAHRAMSOLTANI; FARZAEI; RAHIMI, 2014). Um desses compostos são as tiraminas e seus derivados, que são metabolitos secundários da tirosina e precursoras de catecolaminas, assim como efedrina e anfetaminas dentre outras (RANG et al., 2012). Algumas tiraminas podem ser encontradas conjugadas em plantas sob a forma de alcaloides como, por exemplo, N-trans-coumaroil-tiramina na espécie *Piper sanctum* (MATA et al., 2004), N-feruloil-tiramina na espécie *Piper nigrum* (ABDULAZEEZ et al., 2016) e N-benzoil-tiramina na espécie *Aniba riparina* (BARBOSA-FILHO et al., 1987). A planta do gênero *Aniba*, da família *Lauraceae* conhecida popularmente como “louro” é encontrada na Amazônia Central e Guiana. A espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez possui 3 compostos tiramínicos com atividades importantes no SNC de mamíferos, sendo eles a Riparina I, com atividade antidepressiva e ansiolítica (DE SOUSA et al., 2005); Riparina II, com atividade ansiolítica (SOUSA et al., 2007) e Riparina III com atividade ansiolítica e antidepressiva (SOUSA et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2015; CHAVES RC et al., 2020). Estes compostos apresentam marcada atividade farmacológica de interesse (efeitos ansiolíticos e/ou antidepressivos) sem afetar a atividade locomotora

dos animais, além de possuírem potencial atividade analgésica (MELO et al., 2006; SOUSA et al., 2007; LEITE, 2008; ARAÚJO et al., 2009; LEITE et al., 2010). Além disso foi demonstrado que a administração de Riparina III conseguiu restaurar os níveis de BDNF no hipocampo de animais abrindo perspectivas para continuidade do estudo para elucidar melhor o mecanismo de ação e potencial farmacológico dessa droga (VASCONCELOS, 2015).

O estudo mais aprofundado destas classes de compostos permite avanços nos entendimentos de suas relação estrutura-atividade farmacológica, tão importantes na Química Farmacêutica Moderna e no desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, o estudo com riparinas é pouco completo devido à dificuldade operacional de isolamento desse composto de suas fontes naturais e custos associados. Uma alternativa é o possível trabalho com riparinas obtidas por síntese química (NGAHA NJILA et al., 2017). Com a síntese química é possível facilitar a obtenção, aumentar o rendimento, diminuir os custos e maximizar a pureza da amostra de droga (ATANASOV et al., 2015).

A Riparina A (Fig. 1) é um símile químico das três riparinas (I, II e III) acima citadas, sendo uma estrutura representativa das demais. É um composto totalmente novo, além disso, há pouco estudos na literatura científica sobre o efeito antidepressivo e/ou ansiolítico da Riparina A. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que este composto apresenta forte ação antidepressiva e discreta atividade ansiolítica em modelos agudos e crônicos de depressão e ansiedade em animais (PRINHOLATO et al., 2019).



Figura 1 - Semelhança estrutural entre os diferentes tipos de riparinas (VASCONCELOS et al., 2015).

Os resultados obtidos para Riparina A pelo nosso grupo foram bastante promissores. Todavia, há ainda muito o que desvendar sobre o mecanismo de ação da Riparina A, que ainda permanece em aberto, bem como seu envolvimento nos níveis de expressão gênica e proteicas das principais neurotrofinas (BDNF, VEGF e GluN2B), bem como nos níveis de citocinas, que como dito antes, exercem papéis importante no contexto

da depressão, no seu prognóstico e tratamento (NUNES et al., 2014, 2015; SANTIAGO et al., 2015; JIMÉNEZ et al., 2014; JIANG et al., 2018; GOMES et al., 2021).

Sendo assim, o presente trabalho se baseia na ideia de que a Riparina A possa exercer o seu efeito antidepressivo por meio da modulação dos genes do BDNF, VEGF e/ou GluN2B envolvidos no quadro patológica da depressão, assim como nos níveis das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 através do uso de técnicas bioquímicas e moleculares em ratos expostos ao modelo CUMS de depressão. Dado fato de que muitas riparinas possuem efeito analgésico em adição aqueles efeitos antidepressivo e ansiolítico, este trabalho também se dedicou em avaliar a possível ação analgésica (central e periférica) de diferentes doses de Riparina A por meio dos testes de contorção abdominal, teste de retirada da cauda e o teste plantar, modelos estes bastante consolidados nos estudos de nocicepção e antinocicepção em animais.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade analgésica e validar a atividade antidepressiva da Riparina A na modulação de citocinas específicas e dos genes BDNF, VEGF e GluN2B em modelo animal validado para depressão.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a o efeito da Riparina A na modulação dos genes BDFN, VEGF e GluN2B no hipocampo e córtex de animais submetidos ao protocolo CUMS de depressão;

Avaliar o efeito da Riparina A nos níveis das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 no hipocampo e córtex de animais submetidos ao protocolo CUMS de depressão.

Avaliar a potencial analgesia periférica e central exercida por diferentes doses da Riparina A por meio dos testes de contorção abdominal, teste de retirada da cauda e o teste de Hargreaves em animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fármacos e Reagentes

Foram utilizados Riparina A (RipA) adquirida comercialmente do laboratório Toronto Research Chemical (TRC - Canadá). Tramadol, morfina, AAS, cloridrato de fluoxetina (FLX) e outros reagentes de grau analítico foram adquiridos da empresa Merck.

3.2. Animais

O referido trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto sob o número protocolar: 09/2015. Todos os protocolos experimentais envolvendo animais foram estabelecidos conforme as diretrizes para o uso de animais em pesquisa segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e as normas do *American Guidelines for Animal Care*, evitando o uso irracional de animais.

Os animais foram adquiridos junto a empresa ANILAB (Paulínia-SP), ficando os mesmos alojados em nosso biotério local. Foram utilizados ratos Wistar (150-200g) acondicionados em grupos de 5 animais por gaiola, e mantidos no biotério com manutenção de ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (55%) controladas, sendo disponibilizadas alimentação e água *ad libitum*.

Para os experimentos de CUMS visando o RT-PCR, western blot e análise de citocinas os animais foram divididos em 4 grupos ($n=7$ cada). Grupo 1: Controle negativo tratado com salina (CN) sem passagem pelo protocolo CUMS; Grupo 2: Animais que passaram pelo CUMS sem tratamento (CUMS); Grupo 3: Animais tratados com Riparina A 10 mg/kg e que passaram pelo CUMS (RipA/CUMS) e Grupo 4: Animais tratados com Fluoxetina 10 mg/kg e que passaram pelo CUMS (ADP/CUMS). Todos os grupos receberam tratamentos via intraperitoneal (i.p) 30 minutos antes de qualquer experimento, quando cabível.

Já para os experimentos de analgesia periférica foram utilizados camundongos Swiss machos (25-30g) divididos em 5 grupos ($n=7$ cada). Controle negativo tratado com salina, controle positivo tratado com AAS 20mg/kg, e grupos tratado com a Riparina A 2,5mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg. Para os testes de analgesia central (teste de retirada da cauda e teste plantar) foram utilizados ratos Wistar machos (150-200g) divididos em 5 grupos ($n=7$ cada). Controle negativo tratado com salina, controle positivo tratado com Tramadol 50mg/kg e grupos tratados com Riparina A 2,5mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg. Todos por via i.p.

3.3. Protocolo do *Chronic Unpredictable Mild Stress* (CUMS)

O protocolo consiste em uma série de insultos estressantes (CUMS) sucessivos e de natureza distinta descritos por Kumar, Kuhad e Chopra, (2011), com algumas modificações. Tais estímulos realizados sucessivamente fazem com que os animais mimetizem o comportamento depressivo por tempo prolongado, definido como comportamento depressivo crônico.

Uma população de 28 animais ($n=28$) foi tomada e estratificada em 4 grupos contendo 7 animais cada ($n=7$ /grupo). Dos grupos formados, o grupo 1 não recebeu nenhum estímulo estressante, recebendo apenas o tratamento com solução salina, controle negativo (CN), os demais grupos receberam o tratamento com fluoxetina e Riparina A 10 mg/kg, diariamente a partir do 8º dia. Os demais grupos (3), passaram por diferentes situações de estresse uma vez ao dia entre 09h00 e 14h00 durante 28 dias. Os estímulos estressantes do protocolo CUMS estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 1 - Cronograma do procedimento CUMS

<i>SEMANA</i>	<i>SEG</i>	<i>TER</i>	<i>QUA</i>	<i>QUI</i>	<i>SEX</i>	<i>SÁB</i>	<i>DOM</i>
<i>SEM1</i>	C	F	O	S	F	D	N
<i>SEM2</i>	X	C	F	O	S	N	D
<i>SEM3</i>	F	S	X	N	O	C	N
<i>SEM4</i>	O	S	D	X	N	C	F

C— “nado gelado” (12°C, 5 min); F—privação de comida e água (24 h); O—iluminação por 24h; N—sem estresse; S—nado normal (23 ± 2°C, 15 min); F—exposição a objeto estranho por 24 horas (ex. garrafa de vidro; D—caixa suja (24h); X—caixa inclinada (45 graus) por 7 horas.

Do dia 1-7 (sem1), os animais foram submetidos ao CUMS sem qualquer tipo de tratamento. No intervalo do 8º dia (sem2) até o dia 28 (último dia da sem4) foi realizado tanto o procedimento CUMS quanto o devido tratamento pertinente aos grupos (com antidepressivo ou Riparina A). Os tratamentos diários entre o 8º dia até o 28º dia ocorreram 30 minutos antes de cada atividade estressante. No 29º dia após a finalização do protocolo de CUMS, os animais foram eutanasiados, e o hipocampo e córtex de cada animal coletados.

3.4. Ensaio Bioquímicos

3.4.1. Dissecção Hipocampal

Os animais foram anestesiados previamente com isoflurano e logo em seguida foram decapitados. Após a decapitação, os encéfalos foram retirados imediatamente e colocados sobre papel alumínio, rente a uma placa de petri com gelo, para iniciar a lavagem com salina estéril e dissecção do hipocampo e córtices de cada animal. Ao final da dissecção, as áreas foram colocadas em *ependorfs* devidamente identificados, pesados e conservados a -70°C para uso posterior.

3.5. Quantificação mRNA – RT-PCR

Primeiramente foi realizado a padronização dos *primers* (senso e anti-senso) para determinação das concentrações ideais da reação de RT-PCR, utilizando-se de primers específicos para BDNF, VEGF e GluN2B e para o gene de referência GAPDH (Tabela 2). Após a padronização, foi realizado a síntese de cDNA. Para cada síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher™): 10x RT Buffer (2µL), 25x dNTP Mix (0,8µL), 10x RT Random Primers (2µL), MultiScribe Reverse Transcriptase (1µL), Nuclease-free H₂O (4,2µL) totalizando 10µL do Mix mais 10µL da amostra 20ng diluída (1:4) de modo a se completar o volume final de 20µL para cada reação. A síntese foi realizada no termociclador sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Após a

padronização dos primers e extração de RNA, foi feito o experimento de RT-PCR em tempo real com as amostras tratadas.

A RT-PCR foi realizada por SYBR® Green JumpStart Taq ReadyMix for RT-PCR (#S4438 Sigma Aldrich – EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de amplificação foram preparadas em tubos ópticos, em triplicata, contendo Jump Start Taq Ready Mix, Reference Dye, primers, produto da reação RT (cDNA) e água livre de nuclease. Em seguida levadas ao Termociclador MXPRO 3005 (Stratagene™) e submetidas às seguintes condições de ciclagem: 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, com volume final de 25µL.

Os dados obtidos na reação de RT-PCR foram analisados de acordo com o método 2-ΔΔCt proposto por Livak e Schmittgen (2001). O cálculo baseia-se na comparação dos valores de Ct (do inglês, *cycle threshold*), expresso em unidades arbitrárias, entre os grupos de amostras no momento em que o RT-PCR atinge a fase exponencial de amplificação. De acordo com este modelo, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} \text{fold-change} &= 2^{-\Delta\Delta C_t} \\ \Delta C_t &= C_t \text{ do gene-alvo} - C_t \text{ do gene referência} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_{t_1} - \Delta C_{t_2} \\ \Delta C_{t_1} &: \text{amostra de interesse} \\ \Delta C_{t_2} &: \text{amostra do grupo controle} \end{aligned}$$

Tabela 2 - “Primers” utilizados para o RT-PCR.

GENE	DIREÇÃO	“PRIMER”
BDNF ^A	Fwd.	5'-GCAGCCTTCTTTTGTGTAACC-3'
	Rev.	5'-AGAGTGATGACCATCCTTTTC 3'
VEGF ^B	Fwd.	5'-GGTAGCTGAGGACGCAGTGT-3'
	Rev.	5'-GGTAGCTGAGGACGCAGTGT-3'
GLUN2B ^C	Fwd.	5'-CUCAGAAGAAGAAUCGGAA 3'
	Rev.	5'-UUCCGAUUCUUCUUCUGAG-3'

^A (Yang et al., 2020); ^B (Jiang et al., 2018); ^C (Tan et al., 2005).

3.6. Quantificação da proteína – Western Blot

Para avaliar a expressão proteica hipocampal e cortical para cada um dos alvos moleculares e diferentes grupos animais foi realizado o ensaio de Western Blotting. Seguindo sequencialmente as seguintes etapas:

Extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

- Preparação do Extrato Total de Proteínas

Os tecidos hipocâmpais e corticais foram homogeneizados separadamente e manualmente em 2 mL de tampão de lise RIPA 01X (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% Triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma Aldrich, EUA, 1 µL de inibidor de protease: 100 µL de RIPA) usando um pistão de vidro (Potter). Os homogenatos foram então centrifugados a 12.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, sendo os sobrenadantes, contendo o extrato de proteínas de todos os compartimentos celulares, coletados ao final do processo. Os pellets residuais foram descartados. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate – BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Todos os procedimentos foram realizados com as amostras imersas em gelo,

- Eletroforese e transferência das proteínas

A partir da quantificação da concentração de proteínas em cada amostra, estas foram preparadas, ou seja, reduzidas e desnaturadas, para eletroforese, adicionando um tampão de frente contendo SDS, agente redutor e água Milli-Q, de maneira a atingir uma concentração final de 1 µg de proteína/µL. Após o preparo, as amostras foram colocadas no banho seco por 5 minutos a 70°C a fim de ajudar no processo de desnaturação das proteínas. Em uma cuba de eletroforese contendo tampão de corrida, as amostras foram carregadas no gel de poliacrilamida, juntamente com o padrão de peso molecular. A corrida do gel colocada numa voltagem de 90V por aproximadamente duas horas e meia, sempre acompanhando a corrida através do padrão de peso molecular.

Após a eletroforese, foi feito o processo de transferência das proteínas separadas no gel para uma membrana de nitrocelulose. Em uma cuba de transferência, foi montado um “sanduíche” onde o gel foi colocado adjacente a membrana, com a membrana próxima ao polo positivo da cuba. A transferência foi feita pela aplicação de um campo elétrico de voltagem crescente: 20 minutos - 10 V, 20 minutos - 20 V, 20 minutos - 30 V, 20 minutos - 40 V, 30 minutos - 50 V.

Confirmada a transferência, a membrana foi lavada com salina tris-tamponada mais Tween 20 (TBST 0.1%), 3 vezes de 10, 5 e 10 minutos respectivamente, para retirada do marcador. Em seguida, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo com a membrana, foi realizado o bloqueio da mesma com uma proteína neutra, para tanto, a membrana foi mergulhada em uma solução de TBST, BSA 2% por uma hora e meia. Ao término do bloqueio, a membrana foi novamente lavada em TBST, como descrito a pouco, e então incubada com os anticorpos NR2B (NMDAε2 Antibody (A-8) -prod # SC-365597) Santa Cruz Biotechnology – diluição 1:100), anti-BDNF (ab203573) Abcam - diluição 1: 1500, anti-VEGF-A de coelho (AB1876-I) Sigma – diluição 1:1000. Após a incubação com os anticorpos primários, foi feita outra lavagem, e então as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG-BP-HRP (SC-516102) Santa Cruz Biotechnology – diluição 1:1000; anti-coelho IgG A0545 – Sigma) por 1 hora. Em seguida foi feita uma nova lavagem e prosseguir com a detecção das proteínas, onde as membranas foram incubadas por 5 minutos com o reagente de quimiluminescência ECL (GE Healthcare Life Science). Imediatamente após a incubação foi feita a leitura das membranas, por meio do foto documentador para géis membranas de Western Blot – CHEMI, após revelação as imagens foram analisadas no programa Image J, onde foi analisada cada banda.

3.7. Avaliação dos níveis de citocinas - ELISA

Hipocampus e córtices dos animais foram homogeneizados em banho de gelo em tampão RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) mais 1% de coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os níveis de TNF- α e IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 foram avaliados usando os kits ELISA (Sigma-Aldrich). Este ensaio emprega um anticorpo específico para rato TNF- α e IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 100 μ L de amostras foram pipetadas em uma placa de poço ELISA pré-revestida com Anticorpos TNF- α e IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 e incubados por 2,5 h à temperatura ambiente com agitação suave. Em seguida, os poços foram lavados com tampão de lavagem e anticorpos biotinizados anti- TNF- α e IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 de ratos foram adicionados a cada poço. Após a lavar o anticorpo biotinizado não ligado, 100 μ L da estreptavidina conjugada com HRP, "solução de substrato" (1xH₂O₂: 1x tetrametilbenzidina) foi pipetada nos poços e incubada por 45 min em temperatura. Todos os poços foram novamente lavados, 100 μ L de uma solução de substrato TMB foi adicionada e incubada

por 30 min. Por fim, a solução de parada (2N H₂SO₄) foi adicionada, e a cor do meio sofreu mudança de azul para amarelo. A densidade óptica de cada poço foi avaliada pelo leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm. Cada amostra foi testada em triplicata.

3.8. Avaliação da Atividade Antinociceptiva

3.8.1. Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Seguindo a metodologia descrita por Koster e colaboradores (1959), os animais foram divididos 5 grupos ($n=07/\text{grupo}$), o controle negativo tratados por via i.p. com veículo (salina), um grupo controle positivo tratado com AAS [Ácido acetilsalicílico - 20 mg/Kg; i.p] e grupos tratados i.p. com diferentes doses de Riparina A (2,5 mg/kg); (5,0 mg/kg) e (10mg/kg). Após 60 minutos (min) dos tratamentos, em todos os animais foi injetado ácido acético diluído em salina (0,1 mL de Ácido acético 1%, i.p) e após 05 minutos, foram contadas as contorções abdominais pelos próximos 30 minutos, entendidas como a contração da parede abdominal seguida pela extensão de pelo menos uma das patas posteriores (VACHER et al., 1964). Os resultados foram expressos como as médias dos números de contorções acumuladas durante os 30min da avaliação experimental ou pela porcentagem de inibição das contorções em comparação com os grupos controles.

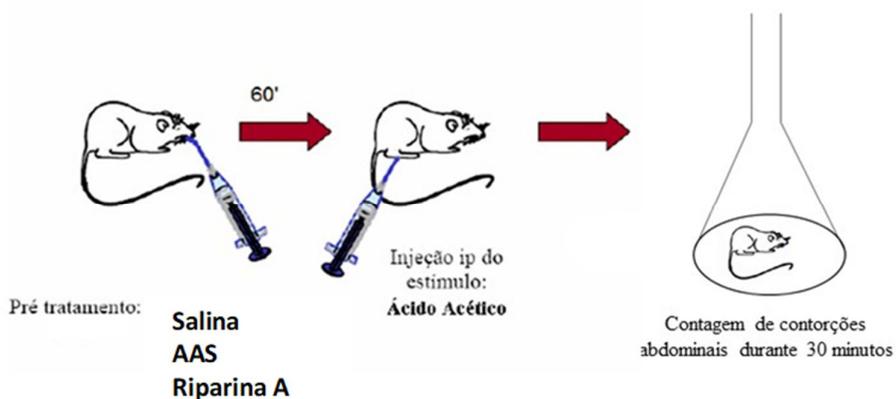


Figura 2 - Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (Adaptado de VALE, 2000).

3.8.2. Teste de *Tail Flick*

Seguindo a metodologia descrita por D'Amour e Smith (1941), este ensaio permite o estudo de drogas com atividades semelhante aos opioides, mediante a avaliação do tempo, em segundos (s), que o animal leva para retirar a cauda do local de incidência de um estímulo térmico doloroso. Este estímulo nociceptivo foi produzido por um foco de luz convergente na cauda, obtido de um analgesímetro térmico. Após 1 hora das diferentes administrações i.p. do veículo salina (100 μ L), do composto Riparina A em diferentes doses (2,5, 5,5 e 10mg/kg) e do controle positivo Tramadol (50 mg/Kg). A latência para o reflexo de retirada da cauda de cada animal (T) após o estímulo nociceptivo foi medida em triplicata a cada 15 minutos por um período completo de 60 minutos.

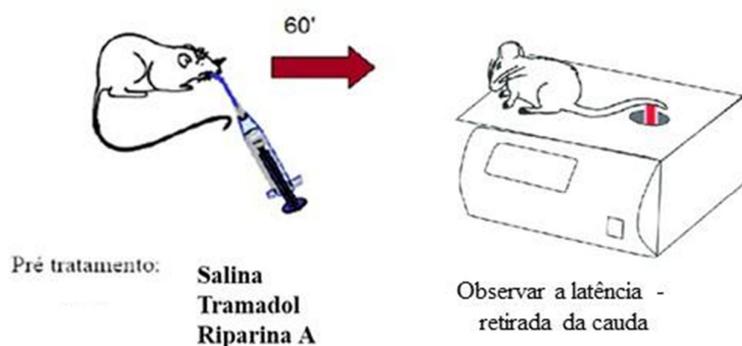


Figura 3 - Teste de retirada da cauda (Adaptado de VALE, 2000; DEUIS et al., 2017).

3.8.3. Teste de Hargreaves

O teste de Hargreaves consiste na observação do tempo que o animal leva para a retirada da pata traseira após a aplicação de fonte de calor infravermelho (HARGREAVES et al., 1988), usando um analgesímetro térmico. O aparelho usado neste trabalho foi o modelo 7360 V-115 da Ugo-Basile. Manualmente, cada animal foi cuidadosamente colocado sobre o aparelho, de modo que a região plantar de sua pata traseira direita ficasse posicionada sobre a fonte da luz infravermelha com potência previamente estabelecida de 50 watts. Na sequência, já com o animal posicionado, a luz infravermelha foi acionada juntamente com um cronômetro eletrônico, possibilitando a contagem do tempo simultaneamente ao estímulo, até que o animal retirasse sua pata, encerrando a contagem. Foi atribuído o limite máximo de 20s para a exposição da pata ao raio infravermelho, evitando possíveis danos teciduais. Em cada animal foram realizadas 3 medidas (0', 5' e 10'min). A média destas medidas representou a latência de

retirada da pata, sendo expressa em segundos, para os diferentes tempos e momentos da avaliação. Os grupos animais ($n=07$ /grupo) foram exatamente os mesmos do teste anterior (*Tail Flick*).

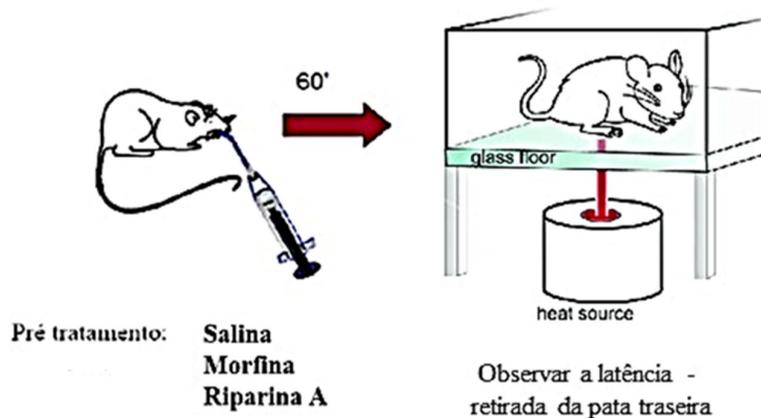


Figura 4 - Teste de Hargreaves (Adaptado de VALE, 2000; DEUIS et al., 2017).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos foram analisados usando ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e ANOVA de duas vias. O teste de Shapiro-Wilk também foi realizado para avaliar a distribuição e normalidade das amostras em todos os experimentos. As análises estatísticas e construções gráficas foram realizadas no programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego – EUA), sendo considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE RNAm POR RT-PCR

4.1.2. Expressão gênica de RNAm-BDNF em animais submetidos ao CUMS

No 29º dia após a finalização do protocolo de CUMS, os animais foram eutanasiados, e o hipocampo e córtex de cada animal foram coletados. Após análise foi possível observar diferença estatística entre os grupos [F (4, 30) =64.00, $p < 0.0001$].

O grupo CUMS/RIP não apresentou diferença significativa com o grupo controle negativo (CN) tratado com salina e não submetido aos CUMS [T= 0.2872, $df=12$, $p > 0.7789$]. Todavia, o grupo CUMS/RIP apresentou aumento significativo dos níveis do RNAm quando comparado com o grupo sem tratamento e submetido ao protocolo CUMS de depressão (77,25 fold change; $p < 0,05$) (Fig. 5). O Controle negativo (CN) em comparação com o grupo sem tratamento (CUMS) também mostrou diferença significativa, sem apresentar a diminuição do RNAm-BDNF na depressão [T=15.21, $df=12$, $p < 0.0001$].

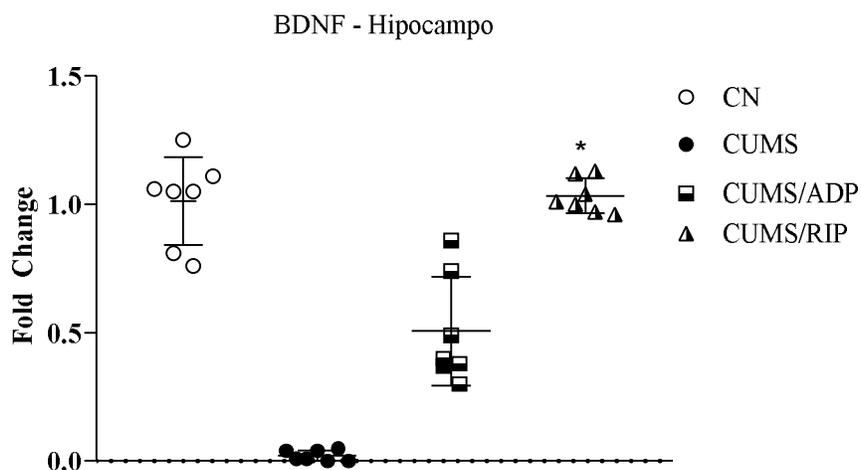


Figura 5 - Expressão gênica relativa do gene BDNF (hipocampo) normalizado com GAPDH, em comparação com controles ($p < 0.0001$ *). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, teste T e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n=7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

Para as análises no córtex foi observada diferença estatística entre os grupos através da análise ANOVA de uma via [F (4, 30) = 6.692, $p < 0.0006$]. Novamente, O grupo CUMS/RIP não apresentou diferença significativa com o grupo controle negativo (CN) tratado com salina e não submetido aos CUMS [T=0.8979, $df=12$, $p > 0.3864$] já entre o grupo (CUMS/RIP) e (CUMS) houve diferença, estando os níveis de RNAm-BDNF maiores no primeiro grupo em comparação ao segundo [T= 3.562, $df=12$, $p < 0.0039$] (5,24 fold change; $p < 0,05$) (Fig.6).

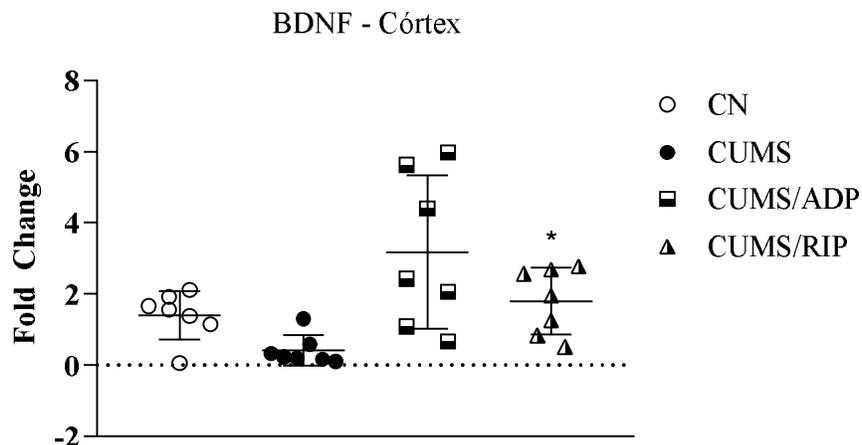


Figura 6 - Expressão gênica relativa do gene BDNF (córtex) normalizado com GAPDH, em comparação com controles ($p < 0.0001^*$). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, teste T e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n = 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

4.1.3. Expressão gênica de RNAm-GluN2B em animais submetidos ao CUMS

Na análise da expressão de GluN2B no hipocampo foi observado diferença entre os grupos [$F(4, 30) = 21.96, p < 0.0001$]. Tanto o tratamento com fluoxetina e riparina reduziram a expressão de GluN2B no hipocampo dos animais que passaram pelos estímulos de estresse CUMS em comparação aos animais que passaram pelo CUMS sem tratamento [$T = 0,1153, df = 12, p > 0,9101$] (0,09 fold change; $p < 0,05$) (Fig.7).

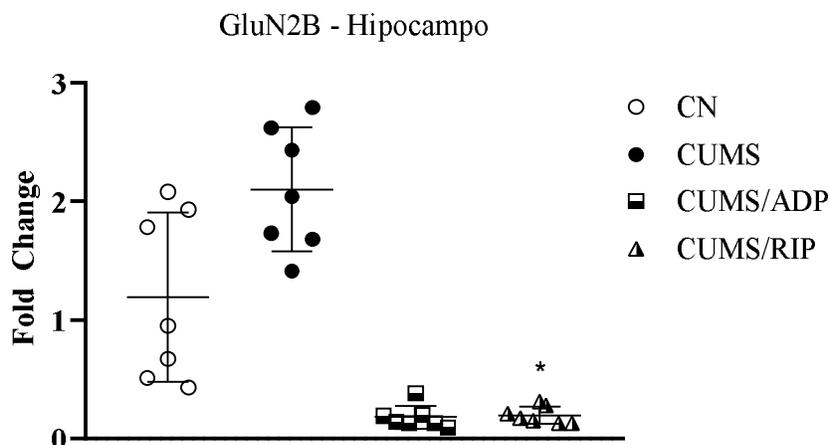


Figura 7 - Expressão gênica relativa do gene GluN2B (hipocampo) normalizado com GAPDH, em comparação com controles ($p < 0.0001^*$). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, teste T e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n = 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

No córtex também foi observada diferença estatística entre os grupos através da análise ANOVA de uma via [$F(4, 30) = 2.964; p < 0.0355$]. Novamente, não houve diferença significativa entre o grupo salina sem ter passado pelo CUMS e o grupo (CUMS/RIP) submetido ao protocolo de depressão [$T = 0.2201, df = 12, 0.8295$]. Existe diferença significativa entre o grupo (CUMS/RIP) e o grupo (CUMS) [$T = 8.721, df = 12, p < 0.0001$] (10,87 fold change; $p < 0,05$), havendo maior nível de RNAm-GluN2B no segundo grupo em relação ao primeiro. Assim, o tratamento com Riparina A impede o aumento da expressão RNAm GluN2B observado nos animais submetidos ao protocolo de depressão sem tratamento com Riparina A ou fluoxetina (Fig.8).

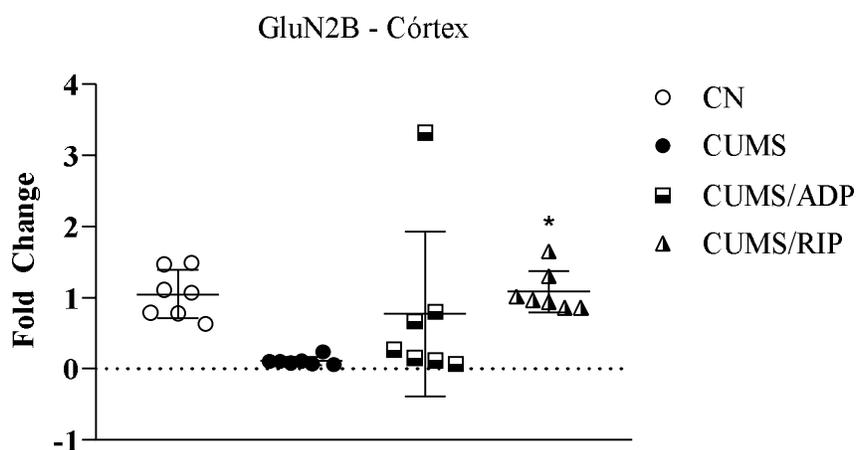


Figura 8 - Expressão gênica relativa do gene GluN2B (córtex) normalizado com GAPDH, em comparação com controles ($p < 0.0001^*$). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, teste T e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n = 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

5.1.3. Expressão gênica de RNAm-VEGF em animais submetidos ao CUMS

Na análise da expressão de VEGF no hipocampo houve diferença entre os grupos [$F(4, 30) = 11.63, p < 0.0001$]. A expressão de VEGF nos animais tratados com riparina

(CUMS/RIP) e fluoxetina (CUMS/ADP) é maior em comparação ao grupo que não foi tratado (CUMS) [$T=6.211$, $df=12$, $p<0.0001$] (19,80 fold change; $p<0,05$) (Fig.9).

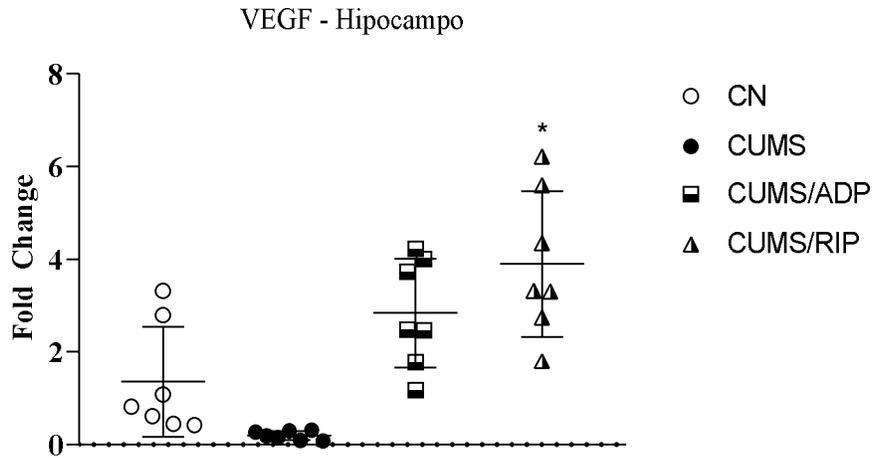


Figura 9 - Expressão gênica relativa do gene VEGF (hipocampo) normalizado com GAPDH, em comparação com controles ($p<0.0001$ *). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, teste T e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n=7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

Para o VEGF no córtex também foi observada diferença estatística entre os grupos através da análise ANOVA de uma via [$F(4, 30) = 2.716$, $p<0.0484$]. Todavia, o tratamento com riparina A não aumentou a expressão de VEGF no córtex dos animais que passaram pelo CUMS (0,57 fold change; $p<0,05$). Não houve diferença significativa quando este grupo quando comparado ao grupo controle CN e CUMS/RIP [$T=0,5099$, $df=12$, $p>0,6194$] (Fig.10).

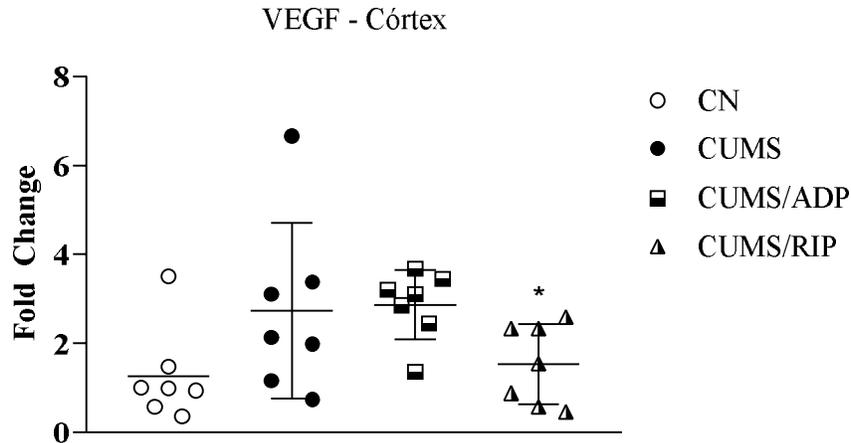


Figura 10 - Expressão gênica relativa do gene VEGF (córtex) normalizado com GAPDH, em comparação com controles ($p < 0.0001^*$). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, teste T e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n = 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

5.2.1. Expressão gênica da proteína BDNF em animais submetidos ao CUMS

Na análise da expressão de BDNF no hipocampo foi observado diferença entre os grupos [$F(4, 30) = 49,01, p < 0.0001$]. O grupo tratado com riparina A (CUMS/RIP) apresenta um nível de expressão proteica de BDNF significativamente maior que o grupo não tratado e submetido ao protocolo de depressão CUMS (CUMS) [$T = 9,432, df = 12, p > 0,0001$], não apresentando diferença com o grupo controle negativo tratado com salina e não submetido ao CUMS (CN) [$T = 1,935, df = 12, p > 0,0769$] (Fig.11a). No córtex, a análise da expressão de BDNF demonstrou diferença entre os grupos $F(4, 30) = 13,13, p < 0.0001$. No entanto, o grupo tratado com riparina A (CUMS/RIP) teve diferença estatística quando comparado ao grupo controle negativo (CN (CUMS)) [$T = 2,671, df = 12, p < 0,0204$], mas também foi diferente do grupo que passou pelo protocolo CUMS sem tratamento (CUMS), havendo uma maior expressão de BDNF no grupo tratado com a Riparina A [$T = 3,165, df = 12, p < 0,0081$] (Fig.11b).

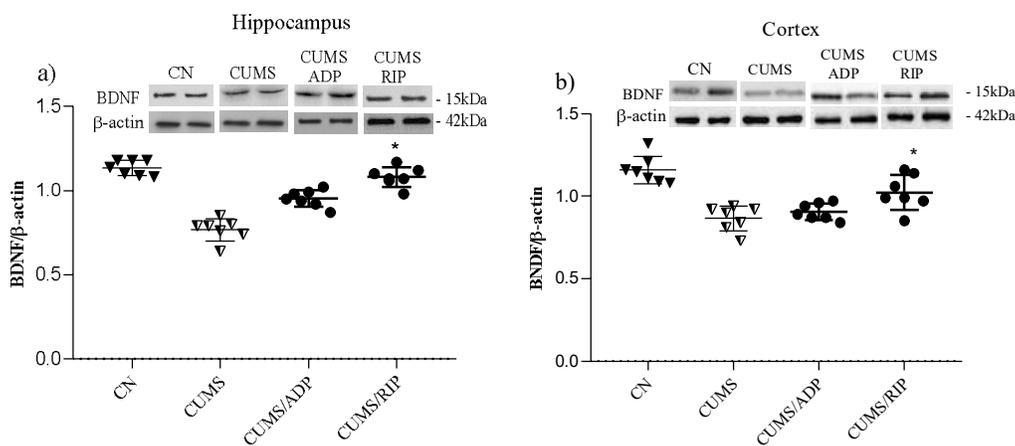


Figura 11 - Expressão gênica da proteína BDNF (hipocampo e córtex) normalizado com β -actin, em comparação com controles ($p < 0.0001^*$). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n=7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

Os resultados aqui apresentados mostram que os animais tratados com Riparina A que passaram pelo protocolo de CUMS tiveram um aumento de BDNF em comparação os animais que não foram tratados com riparina A e também submetidos ao protocolo de indução da depressão. Esses resultados são mostrados tanto em nível do RNAm nos experimentos de RT-PCR quanto no nível proteico de BDNF demonstrado pelo Western Blotting, sendo os resultados de ambos os testes concordantes entre si. Assim, os resultados de Western Blotting corroboram com os resultados obtidos por RT-PCR tanto no hipocampo quanto no córtex dos animais. Diversos estudos relatam que o estresse diminui a expressão hipocampal de BDNF enquanto drogas antidepressivas revertem ou impedem tal diminuição (PHILLIPS, 2017; YANG et al., 2020; DINIZ et al., 2021). O BDNF tem um papel importante na ativação da cascata de sinalização, ativando receptores neurotróficos com papel fundamental para homeostase neuronal, sobretudo no hipocampo e córtex. No organismo exposto ao estresse crônico é observada diminuição dos níveis de BDNF e outras neurotrofinas, reduzindo a neurogênese e aumentando a vulnerabilidade celular (PERITO; FORTUNATO, 2012). E os déficits nos níveis de BDNF bem como em sua função já foram reportados na fisiopatologia da depressão em diversos estudos, assim como sua elevação com a instalação de um tratamento efetivo (MURER et al., 2001; KAREGE et al., 2005).

5.2.2. Expressão gênica da proteína Glun2B em animais submetidos ao CUMS

Na análise da expressão de Glun2B no hipocampo foi observado diferença entre os grupos [F (4, 30) = 10,59, $p < 0.0001$]. O grupo tratado com riparina A (CUMS/RIP) é diferente dos grupos controles, o que inclui importantemente o grupo CUMS [T=4,040, $df=12$, $p < 0.0016$]. Assim como na análise por RT-PCR nos animais que foram tratados com riparina A houve uma diminuição nos níveis de Glun2B, aqui em nível proteico (Fig.12a). No córtex não foi observada diferença estatística entre os grupos através da análise ANOVA de uma via [F (4, 30) = 1.968, $p < 0.1249$], no entanto, o grupo tratado com Riparina A apresentou baixa da expressão da proteína, o que também foi observado no córtex (Fig.12b).

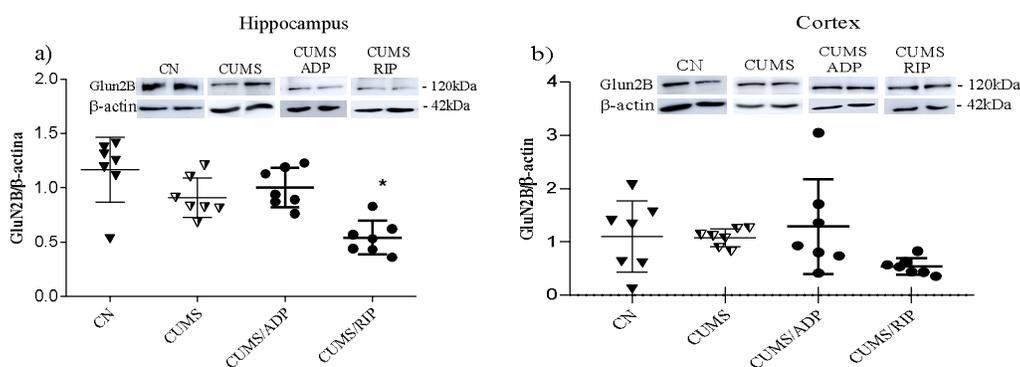


Figura 12 - Expressão gênica da proteína Glun2B (hipocampo e córtex) normalizado com β -actina, em comparação com controles ($p < 0.0001$ *). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina A com (CUMS/RIP).

A subunidade GluN2B faz parte de uma combinação de subunidades proteicas que compõem o receptor glutamatérgico NMDA. Alguns artigos mostram que antagonistas do GluN2B são capazes de evocar uma potente resposta antidepressiva, provocando mudanças significativas de comportamento tanto em pacientes clínicos, como em modelos animais de depressão em roedores (LI et al., 2010; MAENG et al., 2008; PRESKORN et al., 2008; YAN-HAI et al., 2020; UGALE et al., 2021).

Os resultados aqui apresentados, corroboram com a literatura, onde estudos indicam também que agentes moduladores do sistema glutamatérgico têm causado melhora no quadro clínico de pacientes depressivo, sobretudo quando a ação glutamatérgica em algumas áreas cerebrais são diminuídas (MACHADO-VIEIRA et al., 2009; COVINGTON et al., 2010); (FERGUSON & SHINGLETON, 2007; MILLER et

al., 2014; KISELYCZNYK et al., 2015; SKOLNICK et al., 2015). No entanto, apesar de vários estudos o exato mecanismo de ação pelo qual fármacos moduladores do sistema glutamatérgico apresentam efeito antidepressivo não está completamente esclarecido. No entanto e até o momento, os estudos ressaltam a importância da modulação dessa subunidade frente ao estudo do quadro depressivo e de seu tratamento. O tratamento com Riparina A foi capaz de reduzir tanto os níveis de RNAm-GluN2B nos experimentos de RT-PCR quanto nos níveis de proteínas nos ensaios de Western Blotting, tanto no hipocampo quanto no córtex, mostrando que os resultados são complementares e se corroboram.

5.2.3. Expressão gênica da proteína VEGF em animais submetidos ao CUMS

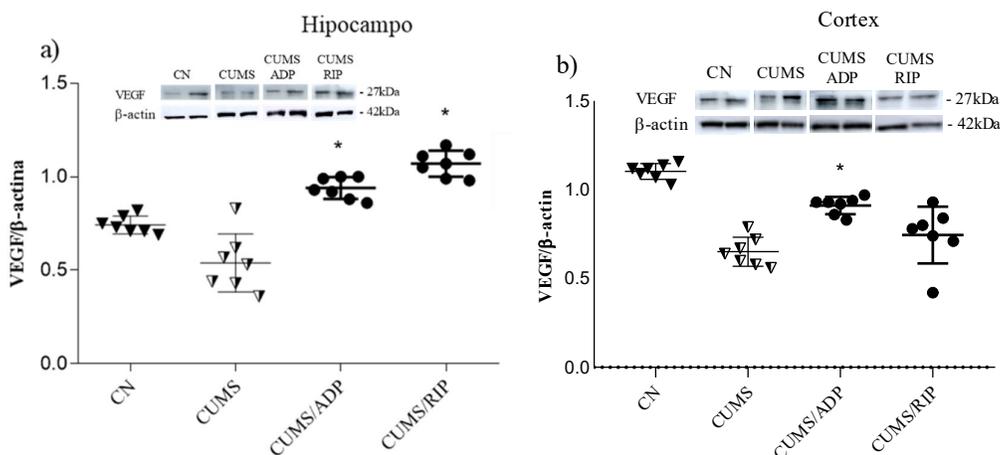


Figura 13 - Expressão gênica da proteína VEGF hipocampo e Córtex normalizado com β -actina, em comparação com controles ($p < 0.0001$ *). As barras mostram o fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) média para cada grupo. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n = 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Na análise da expressão de VEGF no hipocampo foi observado diferença entre os grupos [$F(3, 24) = 43,29, p < 0.0001$]. O grupo tratado com riparina A (CUMS/RIP) é diferente dos grupos controles, o que inclui importantemente o grupo CUMS [$T = 8,211, df = 12, p < 0.0001$]. Assim como na análise por RT-PCR nos animais que foram tratados com riparina A houve aumento nos níveis de VEGF, aqui em nível proteico (Fig.13a). No córtex foi observada diferença estatística entre os grupos através da análise ANOVA de uma via [$F(3, 24) = 30,09, p < 0.0001$], no entanto, o grupo tratado com Riparina A não

apresentou aumento da expressão da proteína, quando comparado com os controles (Fig.13b).

6. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Um número grande de pesquisas tem demonstrado que indutores de citocinas pró-inflamatórias levam ao surgimento de sintomas depressivos (REICHENBERG et al., 2001; CAPURON et al., 2006; KARSON et al., 2012). Já foi observado que os níveis de citocinas pró inflamatórias aumentam durante a depressão com/sem doença crônica adicional e que o quadro depressivo frequentemente acompanha distúrbios inflamatórios (MIKOVA et al., 2001; BRUCE, 2008; GRAFF, 2009; HOWREN, LAMKIN, SULS, 2009; DOUGLASS et al., 2010).

As citocinas utilizadas no presente trabalho IL-1 β , IL-4 IL-6 IL-10 IL-13 e TNF- α são os biomarcadores mais importantes dentro da condição inflamatória característica da depressão (MILLER, MALETIC, RAISON, 2009; MILLER, RAISON, 2016; HASSAMAL S, 2023). Essas citocinas são conhecidas como fatores de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL), podendo ser pró inflamatórias, responsáveis pela inflamação, TNF- α , IL-6 ou anti-inflamatórias, responsáveis por cessar a resposta inflamatória, como IL-4, IL-10 e IL-13 (FREITAS, 2017). Na literatura já foi relatado que essas citocinas têm grande impacto nos principais processos relacionados ao desenvolvimento da depressão, incluindo neuroplasticidade, neurotransmissão, estresse oxidativo e funções neuro endocrinológicas (KENIS; MAES, 2002). E em alguns estudos que utilizaram um tratamento anti-TNF- α foi observado um alívio nos sintomas de depressão e ansiedade em pacientes (TYRING et al., 2006; SONG et al., 2009; MENTER et al., 2010). Essas observações clínicas sugerem que esses agentes que atuam na regulação dos níveis de citocinas podem servir como tratamento alternativo para o transtorno depressivo. Assim, quanto menor o nível de citocinas inflamatórias e maior o nível daquelas anti-inflamatórias em algumas regiões cerebrais, melhor o desfecho positivo na remissão dos sintomas da depressão e na sua recuperação e, pois, no seu tratamento de sucesso. O oposto cursa em favorecer um pior prognóstico e maior manutenção da depressão (HARSANYI et al., 2022; HASSAMAL S, 2023).

Foram mensurados os níveis de TNF- α totais pela metodologia ELISA. O grupo CUMS/RIP não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle salina, e apresentou uma menor quantidade de TNF- α que apresentou diferença significativa em

relação ao grupo CUMS sem tratamento [$T=0,6983$, $df=14$, $p >0,4965$]; [$F(4, 35) = 189,2$, $p < 0,0001$]. Isso mostra que o tratamento com a riparina A promoveu ter um efeito significativo na diminuição de TNF- α no hipocampo em comparação ao grupo CUMS que não recebeu tratamento algum (Fig.14).

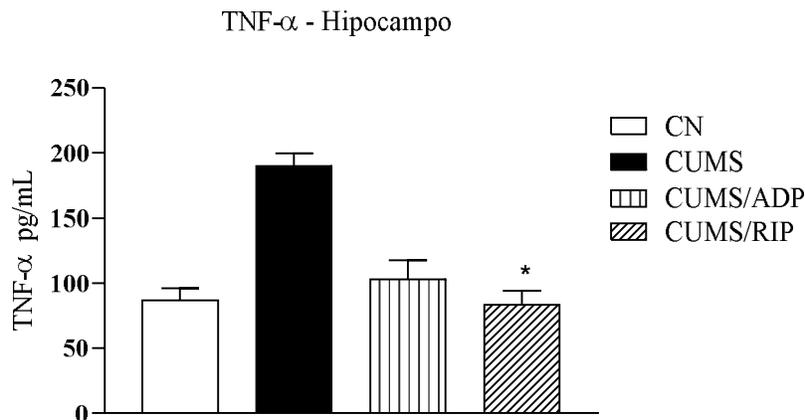


Figura 14 - Mensuração dos níveis de TNF- α na região hipocampal de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n=7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

No córtex, também foi observada diferença estatística entre os grupos [$F(4, 35) = 193,8$, $p < 0,0001$] em comparação ao controle CUMS sem tratamento. E os grupos CUMS/ADP e CUMS/RIP tiveram uma diminuição dos níveis de TNF- α de maneira significativa, a exemplo do que aconteceu no hipocampo (Fig.15).

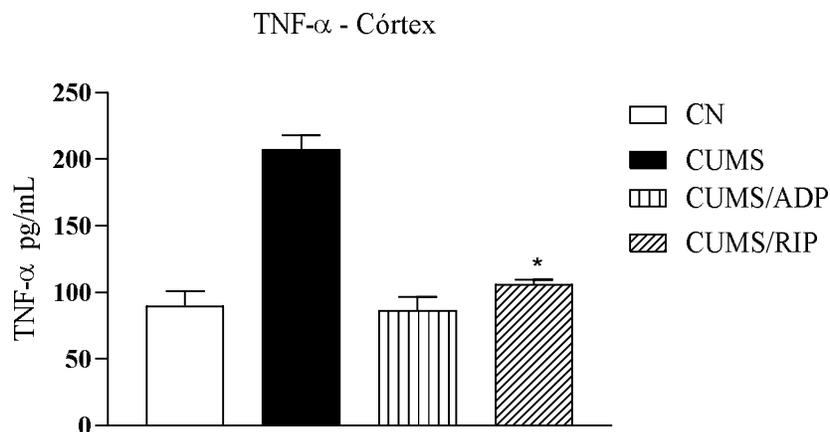


Figura 15 - Mensuração dos níveis de TNF- α na região do córtex de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina e Fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n= 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Ao analisar os dados dos níveis de IL-1 β no hipocampo, foi observada diferença estatística entre os grupos [F (4, 35) = 163,0, $p<0,0001$] (Fig.17). O CUMS/RIP que teve menor expressão desta citocina inflamatória do que o grupo CUMS [T=15,83, $df=14$, $p<0.0001$] (Fig. 15).

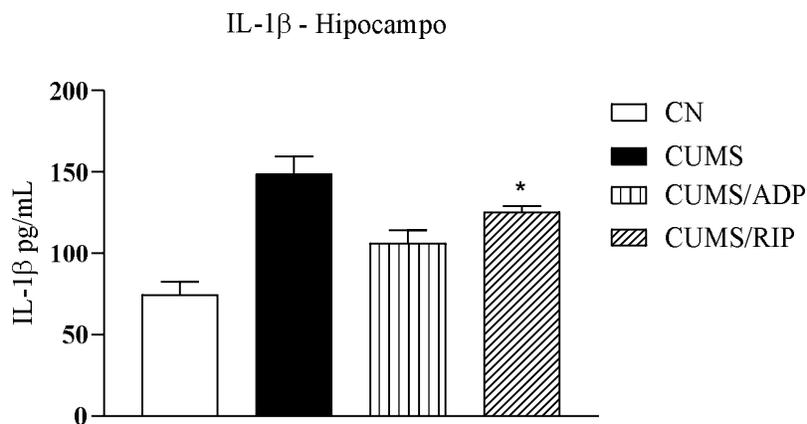


Figura 16 - Mensuração dos níveis de IL-1 β na região hipocampal de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n= 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Na região do córtex, foi observada a mesma situação que no hipocampo, os níveis mais baixos de IL-1 β apareceram no grupo tratado com CUMS/ADP e CUMS/RIP quando comparado com o grupo CUMS, sem tratamento [F (4, 35) = 145,5, $p < 0,0001$] (Fig.17).

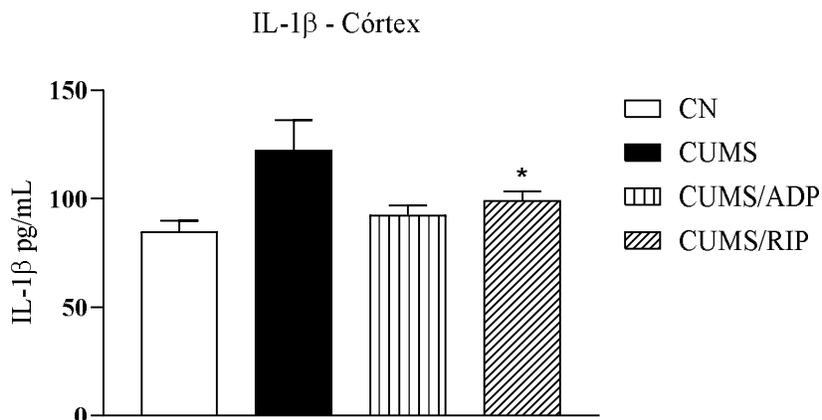


Figura 17 - Mensuração dos níveis de IL-1 β na região do córtex de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

A IL-1 β é um mediador inflamatório primário e induz a formação de outras citocinas pró-inflamatórias. No cérebro saudável, ela é expressa principalmente no hipotálamo, mas também no hipocampo, córtex e tálamo (ROTHWELL, LUHESHI, 2000; WATKINS et al., 1999; PARNET, KELLEY, BLUTHÉ, DANTZER, 2002). A IL-1 β , assim como o TNF- α são citocinas pró-inflamatórias capazes de bloquear dor, elevar o estresse e, quando elevadas desajustadamente em algumas destas áreas cerebrais, podem estar associadas ao quadro de instalação e manutenção da depressão (KOO, DUMAN, 2008).

De fato, a IL-1 β tem um papel importante no quadro depressivo, bem como nas ações celulares do estresse. A administração central e periférica de IL-1 β induz comportamentos da doença, como anorexia, perda de peso, interação social prejudicada e disfunção de memória (GOSHEN, YIRMIYA, 2007; KOO, DUMAN, 2008). Por outro lado, a inibição da ação e sinalização induzidas por IL-1 β resulta no bloqueio desses

comportamentos associados a depressão em animais (YAO et al., 1999; GOSHEN, YIRMIYA, 2009). Nos resultados mostrados acima, o tratamento com riparina A e ADP atenuaram o aumento de TNF-alfa IL-1 β em comparação ao controle CUMS, podendo a modulação de citocinas ter cada vez mais atenção no prognóstico e cura da depressão. Isso é especialmente importante para o caso da Riparina A como potencial ferramenta farmacológica no melhor entendimento das bases moleculares da depressão e, pois, de seu tratamento.

No hipocampo, os níveis de IL-4 tiveram diferença estatística entre os grupos [F (4, 35) = 57,68, $p < 0,0001$] comparado com o grupo CUMS (Fig.18 e 19). O grupo tratado com Riparina A teve diminuição de IL-4 em comparação ao grupo controle CUMS [T=11,29, df=14, $p < 0,0001$]. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura onde foi observado que os níveis de concentração de IL-4 aumentaram à medida que a depressão progrediu (OGŁODEK, 2022).

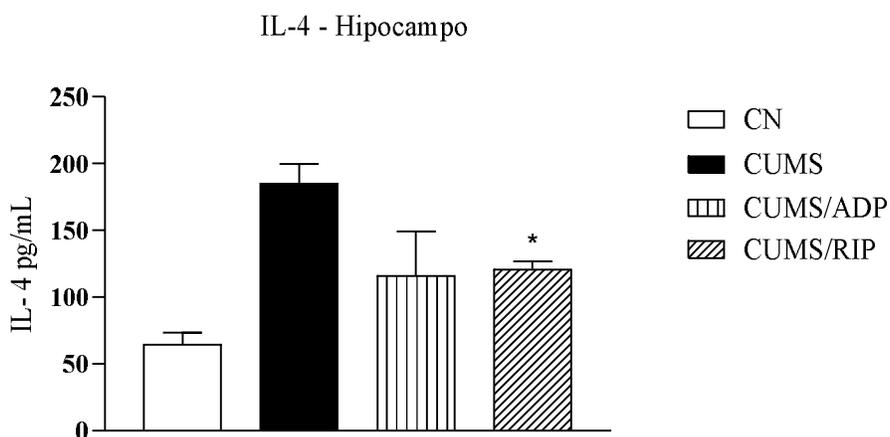


Figura 18 - Mensuração dos níveis de IL-4 na região do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Foi mensurado os níveis de IL-4 pela metodologia ELISA no córtex e foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos F (4, 35) = 197,0, $p < 0,0001$].

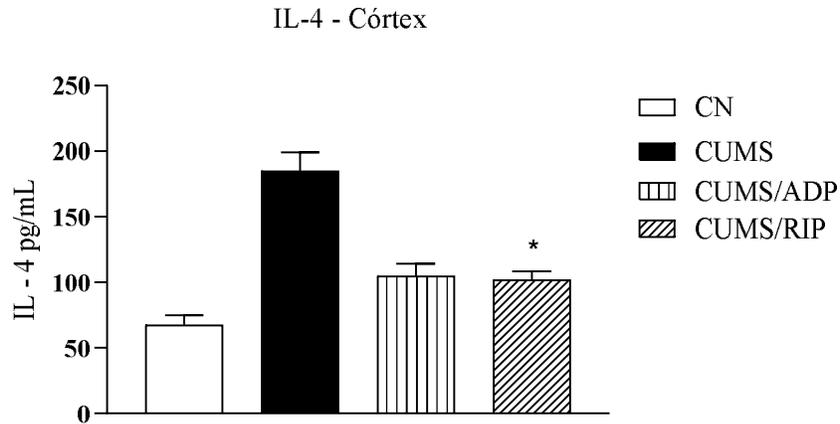


Figura 19 - Mensuração dos níveis de IL-4 na região do córtex de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Nas análises do hipocampo para interleucina IL-6, foi observada diferença estatística entre os grupos F [(4, 35) = 43,20, $p < 0,0001$] (Fig.20). Para as análises do córtex também foi observado diferença estatística entre os grupos F [(4, 35) = 43,20, $p < 0,0001$] (Fig.21). Alguns estudos demonstraram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6, IFN-g, TNF) estão aumentados em pacientes com depressão (FROMMBERGER et al., 1997; THOMAS et al., 2005).

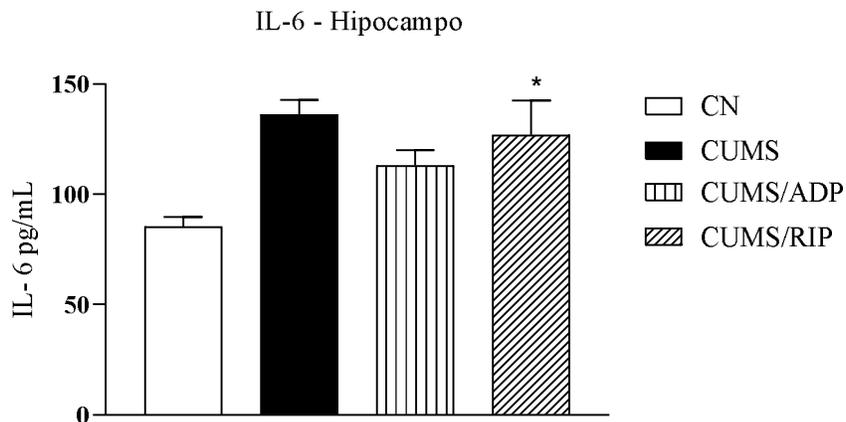


Figura 20 - Mensuração dos níveis de IL-6 na região do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7)

foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

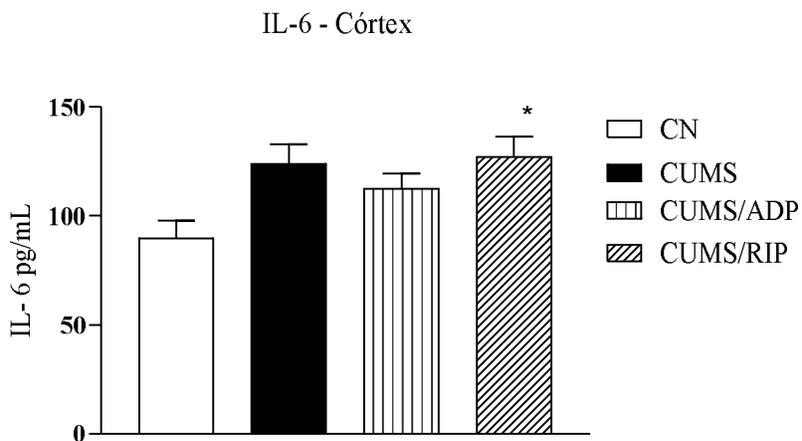


Figura 21 - Mensuração dos níveis de IL-6 na região do córtex de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Quanto a interleucina IL-10 no hipocampo, foi observada diferença estatística entre os grupos $F(4, 35) = 128,7, p < 0,0001$. O tratamento com riparina A teve um aumento de IL-10 em comparação ao CUMS [$T=12,85, df=14, p < 0,0001$] (Fig.22).

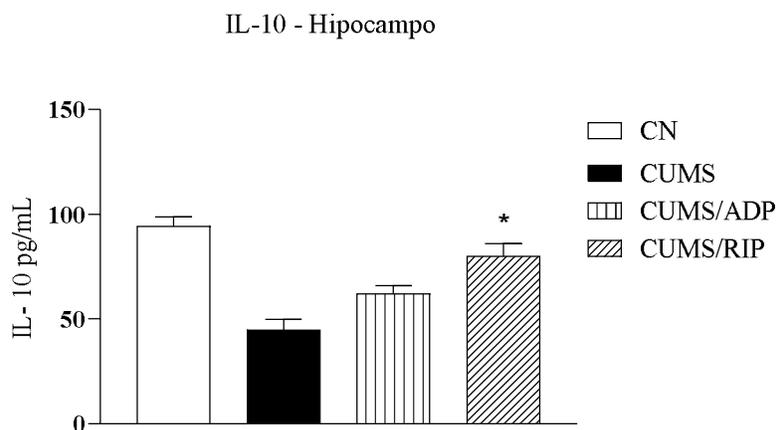


Figura 22 - Mensuração dos níveis de IL-10 na região do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7)

foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

No Córtex, foi observada diferença estatística também entre os grupos $F(4, 35) = 97,07, p < 0,0001$ (Fig.23). Tendo um resultado melhor, o grupo tratado com riparina A não teve diferença do grupo controle negativo e teve diferença quando comparado ao grupo CUMS. A IL-10 dentre as interleucinas anti-inflamatórias tem um papel relevante na depressão (MESQUITA, CORREIA-NEVES, ROQUE, et al., 2008). A modulação da mesma tem forte impacto em vários sintomas associados à depressão. Em alguns estudos a administração de IL-10 e o aumento dos níveis da mesma, após o tratamento com várias classes de antidepressivos tem melhorado o quadro depressivo em modelos animais (MAES, SONG, LIN et al., 1999; KUBERA et al., 2001; ROQUE et al., 2009).

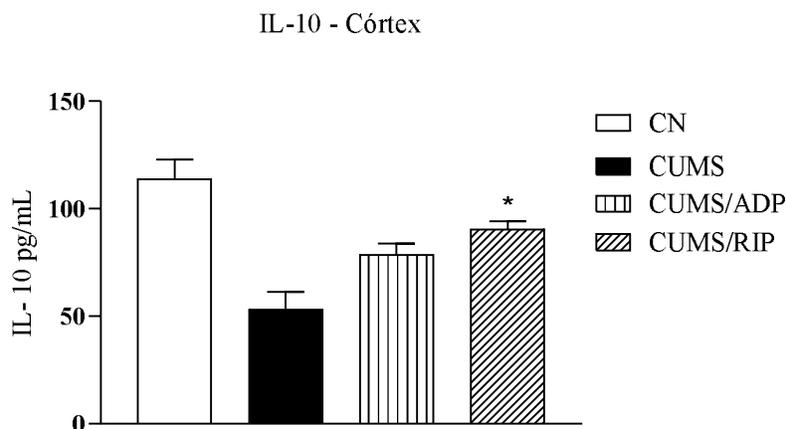


Figura 23 - Mensuração dos níveis de IL-10 na região do córtex de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

A interleucina-10 (IL-10), também é referida como principal citocina envolvida na regulação negativa de reações inflamatórias. A IL-10 é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (LOBO et al., 2016). Além disso, desempenha um papel, na regulação da neurogênese e neuroproteção, influenciando os processos de plasticidade sináptica no hipocampo (HAN et al., 2015).

E por último foi mensurado os níveis de IL-13, no hipocampo e córtex, foram observadas diferença estatística entre os grupos $F(4, 35) = 57,85, p < 0,0001$; $F(4, 35) = 101,2, p < 0,0001$ respectivamente, quando comparado ao grupo CUMS (Fig.24;25). No entanto, apesar do baixo nível dos grupos tratados em comparação ao CUMS, ainda assim os níveis de IL-13 se encontram aumentados em comparação ao controle negativo principalmente no córtex.

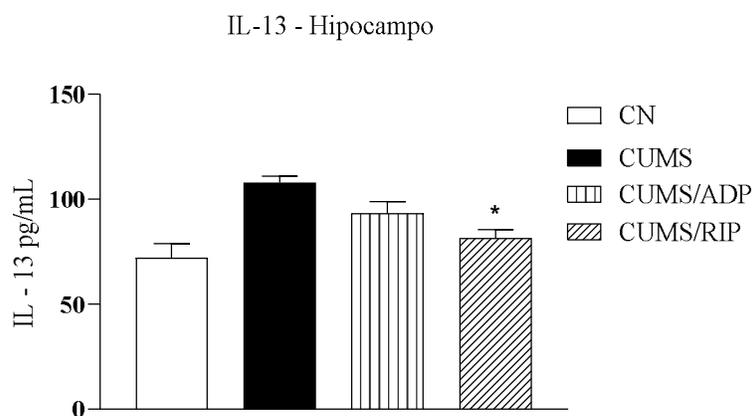


Figura 24 - Mensuração dos níveis de IL-13 na região do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

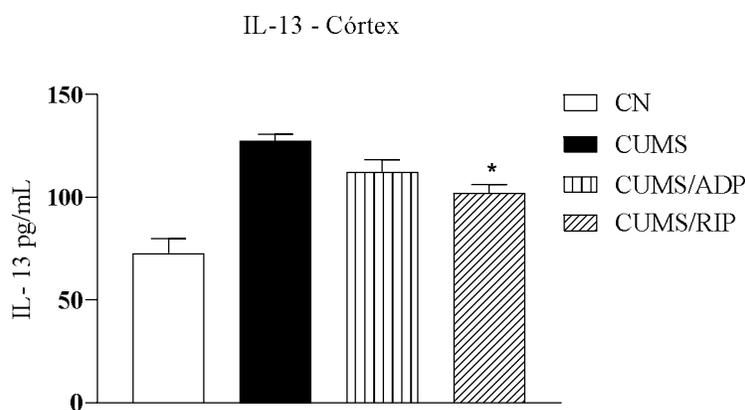


Figura 25- Mensuração dos níveis de IL-13 na região do córtex de ratos submetidos ao modelo de estresse CUMS e tratados com Riparina A e cloridrato de fluoxetina pela metodologia ELISA. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais (n= 7) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Diante do que foi apresentado, é possível notar a importância da modulação e compreensão dos mecanismos de ação mediados por essas citocinas em processos patológicos. Isto inclui dados importantes acerca do melhor entendimento da depressão e de seu tratamento. Cada vez mais, tem surgido estudos abordando o papel dessas citocinas em diversas doenças, na depressão já foi mostrado que elas estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento da mesma, e agentes que atuam na regulação dessas citocinas têm chamado bastante atenção, uma vez que, o surgimento de um tratamento que atue diminuindo citocinas inflamatórias e melhorando os sintomas vem sendo o ponto chave no meio farmacêutico/ científico há algum tempo. Os resultados apresentados sugerem que a riparina A consegue atuar na regulação de algumas citocinas e pode tornar uma peça chave no tratamento da depressão.

6.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

5.4.1. Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Os tratamentos pela via intraperitoneal com o composto Riparina (2,5, 5 e 10mg/kg) reduziu, de forma dose dependente, o número de contorções abdominais provocadas pelo ácido acético. Deste modo, foram observadas, reduções de 30% (28 contorções), 32,5% (27 contorções) e 40% (24 contorções) quando comparado ao grupo tratado com salina (40 contorções), o que mostra ao menos um efeito analgésico periférico moderado para a Riparina A. O grupo controle positivo tratado com AAS (20 mg/kg) produziu inibição de 55% das contorções (18 contorções) (Fig. 26; Tabela 3).

Tabela 3: Influência do pré-tratamento com o composto riparina no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

TRATAMENTOS	DOSES (mg/Kg)	CONTORÇÕES ABDOMINAIS (30MIN)	% INIBIÇÃO
SALINA	-	40	-
RIPARINA A	2,5	28	30%*
RIPARINA A	5	27	32,55%*
RIPARINA A	10	24	40%*
AAS	20	18	55%*

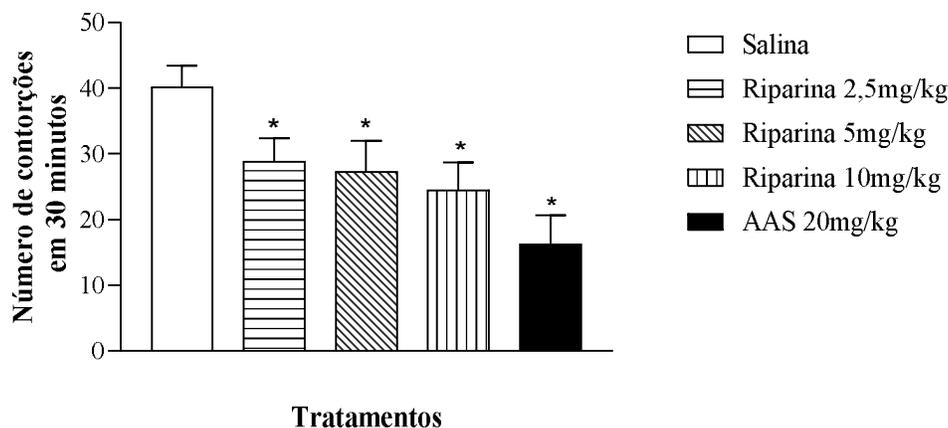


Figura 26 - Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 7 animais $p < 0,0001$. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n = 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Alguns estudos mostram bem essa correlação entre a potência de drogas analgésicas neste modelo e eficácia clínica (SIEGMUND et al., 1957; NODINE; SIEGLER, 1964; PONG et al., 1985; DUBINSKY et al., 1987). Quando o ácido acético é injetado por via intraperitoneal induz de forma indireta o aparecimento de contorções abdominais, agindo através da liberação de mediadores endógenos que estimularão os neurônios nociceptivos sensíveis (FISCHER et al., 2008). A sensibilização destes nociceptores ocorre através da liberação de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina, citocinas e prostaglandinas. Este modelo também induz a liberação de TNF- α e IL-1 β , mediadores diretamente ligados aos processos inflamatório e nociceptivo, tendo sido caracterizado que anticorpos anti-TNF- α e anti-IL-1 β inibem as contorções abdominais (VERRI et al., 2006), comprovando a relação do modelo com processos inflamatórios e nociceptivos.

5.4.2. Teste de *Tail-Flick*

No método de *Tail-Flick*, a administração via intraperitoneal do composto riparina A (10mg/kg) promoveu alteração no tempo de latência para a resposta ao estímulo térmico em 41,03%; 46,34%; 12,50%, 26,19% e 31,58%, para os respectivos tempos (0, 15, 30, 35, 60), quando comparado as latências observadas para o grupo salina.

Como esperado, o controle positivo Tramadol (50mg/kg) diminuiu o tempo de reatividade dos animais ao estímulo térmico em 79,49%; 70,73%; 45,83%; 42,86% e 60,53%, para estes mesmos tempos (0, 15, 30, 35, 60), quando comparado ao grupo controle (Tabela 4 e Fig.27). Isto mostra um efeito analgésico central moderado e induzido pela Riparina A, sobretudo em sua maior dose, especialmente quando comparamos seus efeitos com o Tramadol.

Tabela 4: Influência do pré-tratamento com o composto riparina A na dose 10mg/kg, 5mg/kg e 2,5mg/kg sob o período de latência ao estímulo térmico nociceptivo, no teste de retirada da cauda. Os valores apresentados para cada tratamento e em cada período estão expressos em segundos $p<0,0001$ $n=7$ animais.

LEITURAS (MIN)	SALINA	TRAMADOL (50mg/Kg)	RIPARINA (10mg/Kg)	RIPARINA (5mg/Kg)	RIPARINA (2,5mg/Kg)
0	3,9	7	5,5	4	3
15	4,1	7	6	4,4	3,9
30	4,8	7	5,4	3,4	3,8
45	4,2	6	5,3	4,3	3,3
60	3,8	6,1	5	3,9	3,8

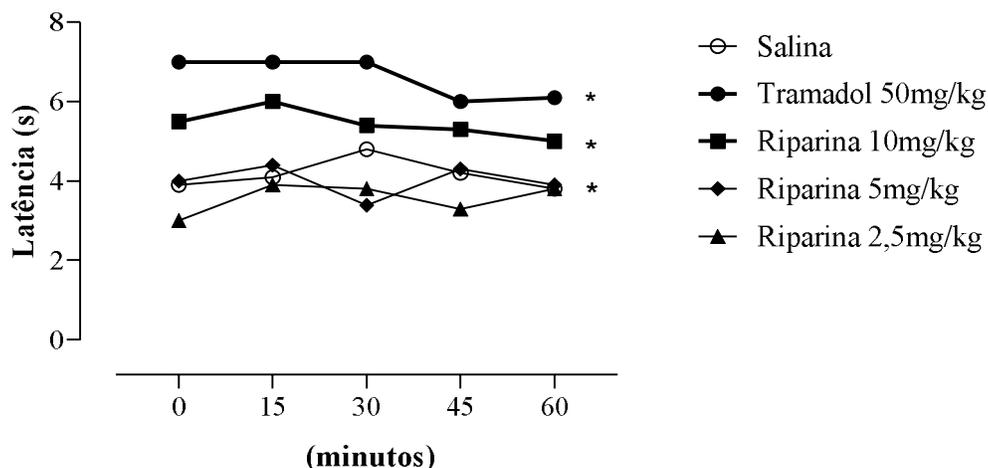


Figura 27- Tempos de latência (segundos) para os intervalos de avaliação no teste de teste de retirada da cauda. Os símbolos e barras representam as médias \pm o erro padrão das médias de grupos experimentais contendo 7 animais $p<0,0001$. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n= 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

O teste de retirada da cauda consiste na aplicação térmica de uma fonte radiante de calor na cauda do animal como estímulo nociceptivo, provocando seu movimento de retirada (D`AMOUR; SMITH, 1941), caracterizando-se por uma nocicepção aguda não-inflamatória (ZAKARIA et al., 2006a; FISCHER et al., 2008). Do ponto de vista farmacológico, o método do Tail-Flick é sensível para identificar a atividade presente em extratos vegetais ou isolados a partir dessas, como os sintéticos, o quais se assemelham ao mecanismo produzido por analgésicos opioides (LE BARS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008), dado que a morfina quando administrada é capaz anular respostas de neurônios depois do contato com o incitamento térmico na cauda do animal (DOUGLASS; CARSTENS, 1997).

6.1.3. Teste de *Hargreaves*

No método de *Hargreaves*, a administração via intraperitoneal do composto riparina A (10mg/kg) promoveu aumento progressivo no tempo médio de latência para retirada da pata frente ao estímulo térmico doloroso. Os percentuais de aumento no tempo de latência para esta maior dose foram de 82,05%; 100%; 81,25%, para os respectivos tempos de observação (0, 5, 10 minutos), quando comparado as latências observadas para o grupo salina. Como esperado, o controle positivo Tramadol (10mg/kg) ampliou significativamente a reatividade dos animais ao estímulo térmico em 171,79%;178,05%,164,58%, para os respectivos tempos (0, 5, 10 minutos), quando comparado ao grupo salina (Tabela 5 e Fig.28). Considerando o efeito analgésico central mais pronunciado apenas na maior dose e, ainda sim restrito, quando comparado a droga de escolha Tramadol, podemos sugerir que a Riparina A mais uma vez apresenta efeito analgésico central de eficiência moderada, o que é de valia se associado ao seu forte efeito antidepressivo já anteriormente demonstrado.

Tabela 5: Influência do pré-tratamento com o composto riparina A na dose 10mg/kg, 5mg/kg e 2,5mg/kg sob o período de latência ao estímulo térmico nociceptivo, no teste de plantar – método de *Hargreaves*. Os valores apresentados para cada tratamento e em cada período estão expressos em segundos $p<0,0001$ $n=7$ animais.

LEITURAS (MIN)	SALINA	MORFINA (10mg/Kg)	RIPARINA (10mg/Kg)	RIPARINA (5mg/Kg)	RIPARINA (2,5mg/Kg)
0	11,8	18,5	15	10	10,9
5	10,9	18,2	15	13,3	9,4
10	12,1	20	16	12,3	13,4

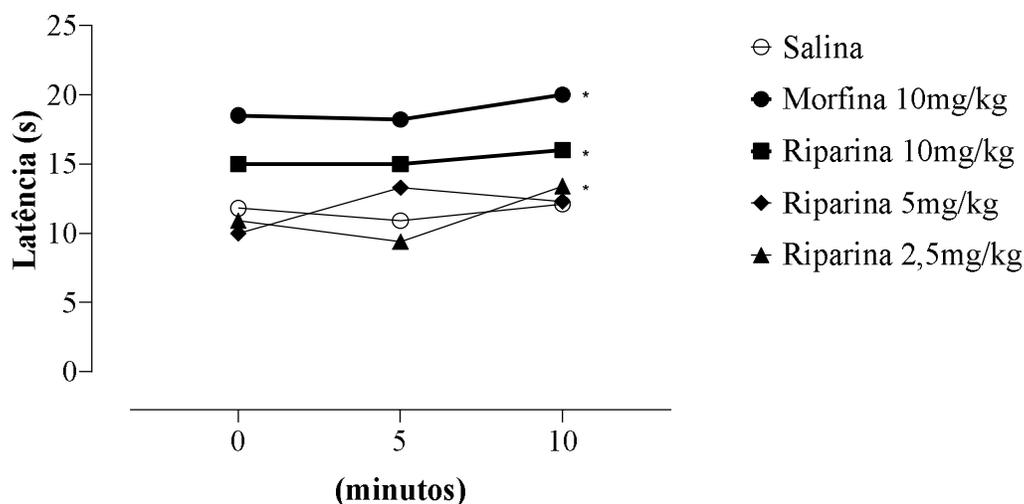


Figura 28 - Tempos de latência (segundos) para os intervalos de avaliação no teste de plantar. Os símbolos e barras representam as médias \pm o erro padrão das médias de grupos experimentais contendo 7 animais $p < 0,0001$. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via e teste de Shapiro-Wilk. Os grupos de animais ($n = 7$) foram divididos da seguinte forma: Controle negativo salina (CN), Sem tratamento apenas com (CUMS), Cloridrato fluoxetina com (CUMS/ADP) e Riparina com (CUMS/RIP).

Considerando que os métodos escolhidos no presente estudo (contorções abdominais, teste de retirada da cauda, teste de plantar) para a avaliação da atividade antinociceptiva, sempre exigiram respostas motoras dos animais, resultados falso positivos poderiam ser obtidos, caso ocorresse perda da coordenação motora dos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. Para descartar tal possibilidade do efeito do composto riparina sobre a motricidade, foi realizado em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, o teste do rota-rod. para avaliar o desempenho locomotor. Neste teste, o tratamento intraperitoneal dos animais com o riparina A nas doses (1,25; 2,5 e 10 mg/kg) não modificou o número de quedas, nem o tempo de permanência dos animais no rota-rod., excluindo a possibilidade de impedimento locomotor como agente causal dos efeitos analgésicos aqui demonstrados (PRINHOLATO et al., 2021). Este resultado

indicou a especificidade do efeito antinociceptiva da riparina A, a qual possui propriedades analgésicas moderadas, sinalizando perspectivas favoráveis para o desenvolvimento de novos estudos que vislumbrem novas doses e outros estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e de toxicidade, que permitam sua melhor caracterização farmacológica.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o tratamento com Riparina A promove a regulação positiva dos genes BDNF, VEGF e a regulação negativa de GluN2B em animais submetidos ao protocolo CUMS. Esses genes estão diretamente envolvidos no desenvolvimento e recuperação/tratamento da depressão. A modulação exercida pela Riparina A cursa positivamente com a recuperação da doença, na medida em que os genes BDNF e VEGF são modulados positivamente e GluN2B negativamente pelo tratamento, tanto nos experimentos de RT-PCR quanto naqueles por Western Blotting. O tratamento também promoveu diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 β e aumentou IL-4 e IL-10, o que também ajuda a explicar o seu mecanismo de ação antidepressivo em adição a modulação dos genes acima citados. A Riparina A apresenta moderado efeito analgésico periférico e central quando comparada às drogas controles de escolha. De fato, e sobretudo em sua maior dose, a Riparina A reduziu significativamente o número de contorções abdominais provocadas pelo ácido acético e promoveu aumento no tempo de latência para a resposta ao estímulo térmico nos diferentes modelos de analgesia utilizados. Esses dados reforçam o potencial da Riparina A como uma nova droga de grande interesse médico-farmacêutico que merece maiores investigações para sua completa caracterização farmacológica.

8. REFERÊNCIAS

- ABDULAZEEZ, M. A. et al. Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, [s.l: s.n.]. p. 277–285. 2015.
- AL-HARBI, KHALID SAAD. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient preference and adherence*, v. 6, p. 369-88, 2012.
- ANACKER, C., ZUNSZAIN, P. A., CARVALHO, L. A. & PARIANTE, C. M. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, v.36, p.415–425, 2011.

- ARAÚJO, É. J. F. DE et al. Pathophysiological investigations, anxiolytic effects and interaction of a semisynthetic riparin with benzodiazepine receptors. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, [s.l: s.n.], 2018.
- ARAÚJO, É. J. F. DE, LIMA, et al. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkaloids from *Aniba riparia* (Lauraceae). *Acta Amazonica*, v.46, n.3, p.309–314, 2016.
- ARAÚJO, F. L. O. et al. Antinociceptive effects of (O-methyl) -N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *methyl) - Archives of Pharmacology*, v. 380, n. 4, p. 337–344, 2009.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- AYŞE KARSON, TUĞÇE DEMİRTAŞ, DİLEK BAYRAMGÜRLER, FUAT BALCI, TIJEN UTKAN. Chronic Administration of Infliximab (TNF- α Inhibitor) Decreases Depression and Anxiety-like Behaviour in Rat Model of Chronic Mild Stress. *Basic & clinical pharmacology & Toxicology*, v.112, n.5, 2012.
- BACELAR JÚNIOR, A. J.; BACELAR, L. F. F.; RIBEIRO, F. F.; ALMEIDA, N. A. S.; SILVA, S. L. Immunology of suffering: the study of depression as a neuroimmunological phenomenon and the use of peripheral biomarkers associated with predisposition, diagnosis and prognosis of depression. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v.13, n.1, p.97-105, 2016.
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Archives of dermatological research*, v. 306, n. 7, p. 601–17, 2014.
- BALDESSARINI, R. J. et al. Duration of initial antidepressant treatment and subsequent relapse of major depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, [s.l: s.n.], 2015.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YONG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2615-2617, 1987.
- BAUNE, BERNHARD T et al. A Network Meta-Analysis Comparing Effects of Various Antidepressant Classes on the Digit Symbol Substitution Test (DSST) as a Measure of Cognitive Dysfunction in Patients with Major Depressive Disorder. *The international journal of Neuropsychopharmacology*, v. 21, p. 97-107, 2018.
- BECKMANN ND, LIN WJ, WANG M, COHAIN AT, CHARNEY AW, WANG P, et al. Multiscale causal networks identify E as a key regulator of Alzheimer's disease. *Nat Commun*. v. 11, p. 3942, 2020.
- BERTOLETE, J. M.; FLEISCHMANN, A. Suicide and psychiatric diagnosis: A worldwide perspective. *World Psychiatry*, n.1, 181-185, 2002.

- BÉTRY, C. A. 5-HT 3 receptor antagonist potentiates the behavioral, neurochemical and electrophysiological actions of an SSRI antidepressant. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.131, p.136–142, 2015.
- BJÖRKHOLM C, MONTEGGIA LM. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*, v.102, p.72-9, 2016.
- BOTEGA, N. J. Comportamento suicida: Epidemiologia. *Psicologia USP*, v. 25, n.3, p. 231-236, 2014.
- BRUCE TO. Comorbid depression in rheumatoid arthritis: pathophysiology and clinical implications. *Curr Psychiatry Rep*. v.10, p. 258–64. 2008.
- CAN, A. et al. The mouse forced swim test. *Journal of visualized experiments: JoVE*, n. 59, p. e3638, 2012.
- CAPURON L, MILLER AH. Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biol Psychiatry*, [s.l: s.n.], p. 819 – 24, 2006.
- CATÃO, R. M. R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. *Rev. bras. anal. Clin*, v.42. n.1 p. 9–14, 2010.
- CHAVES RC, MALLMANN ASV, DE OLIVEIRA NF. et al. The neuroprotective effect of Riparin IV on oxidative stress and neuroinflammation related to chronic stress-induced cognitive impairment. *Horm Behav*, v.122, p.104-119, 2020.
- COVINGTON, H. E., 3RD; VIALOU, V.; NESTLER, E. J. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. *Neuropharmacology*, v. 58, n. 4-5, p. 683-93, 2010.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, J. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.72, p.74-79, 1941.
- DE SOUSA, F. C. F. et al. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytotherapy Research*, v. 19, n. 12, p. 1005–1008, 2005.
- DE SOUSA, F. C. F. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, v. 28, n. 1, p. 95–103, 2014.
- DEUIS et al. Evaluating Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, n. 284, p. 1-17, 2017.
- DIANA K. DOUGLASS, AND E. CARSTENS. Responses of Rat Sacral Spinal Neurons to Mechanical and Noxious thermal stimulation of the tail. *Journal of Neurophysiology*, v.77, p.611–620, 1997.
- DINIZ, D. M., CALABRESE, F., BRIVIO, P., RIVA, M. A., GRANDJEAN, J., & HOMBERG, J. R. (2021). BDNF overexpression in the ventral hippocampus promotes antidepressant- and anxiolytic-like activity in serotonin transporter knockout rats. *Int. J. Mol. Sci*, [s.l: s.n.], 2021.

- DOWLATI Y, HERRMANN N, SWARDFAGER W, LIU H, SHAM L, REIM EK et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, [s.l: s.n.], p. 446–57, 2010.
- DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*, v. 213, n. 1–2, p. 93–118, 2008.
- DUBINSKY B, GEBRE-MARIAM S, CAPETOLA RJ, ROSENTHALE ME. Antialgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. *Agents and Actions*, v.20, n.1/2, p.50-60, 1987.
- DUMAN RS. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues Clin Neurosci*, v.1, p.16, p.11-27, 2014.
- DUSI, N. et al. Brain Structural Effects of Antidepressant Treatment in Major Depression. *Current Neuropharmacology*, v. 13, n. 4, p. 458–465, 2015.
- FAJEMIROYE, J. O. et al. Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 30, n. 3, p. 198–215, 2016.
- FAVA, GIOVANNI A, AND EMANUELA OFFIDANI. The mechanisms of tolerance in antidepressant action. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological Psychiatry*, v. 35,7, p. 1593-602, 2010.
- FERGUSON, J. M.; SHINGLETON, R. N. An open-label, flexible-dose study of memantine in major depressive disorder. *Clin Neuropharmacol*, v. 30, n. 3, p. 136-44, 2007.
- FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL, V.F.; SOUZA, M.M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.32, p.235-239, 2008.
- FREITAS, T. H. Citocinas e quimiocinas como biomarcadores terapêuticos na depressão: revisão sistemática e metaanálise. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- FROMMBERGER UH, BAUER J, HASELBAUER P, FRAULIN A, RIEMANN D, BERGER M. Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, v.247, n.4, p.228-33,1997.
- GOMES, DM et al. Bioactive potential of synthetic riparin analogues: a systematic review. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 16, 2021.
- GOSHEN I, YIRMIYA R. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. *Front Neuroendocrinol*, v. 30, n. 1, p. 30–45, 2009.
- GOSHEN I, YIRMIYA R. The role of pro-inflammatory cytokines in memory processes and neural plasticity. In: Ader R, editor. *Psychoneuroimmunology*, [s.l: s.n.], p. 337–377, 2007.

- GOVONI, S et al. Extrapyraxidal symptoms and antidepressant drugs: neuropharmacological aspects of a frequent interaction in the elderly. *Molecular Psychiatry*, v. 6,2 p. 134-42, 2001.
- GRAFF LA, WALKER JR, BERNSTEIN CN. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: a review of comorbidity and management. *Inflamm Bowel Dis*, v.15, p.1105–18, 2009.
- HAN, A; YEO, H; PARK, MJ et al. IL-4/10 prevents stress vulnerability following imipramine discontinuation. *J Neuroinflammation*, v.12, p. 197, 2015.
- HARSANYI S, KUPCOVA I, DANISOVIC L, KLEIN M. Selected Biomarkers of Depression: What Are the Effects of Cytokines and Inflammation? *Int J Mol Sci*. v.24, p.578, 2022.
- HASSAMAL S. Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. *Front Psychiatry*, v.14, p.113-124, 2023.
- HILES SA, BAKER AL, DE MALMANCHE T, ATTIA J. A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: exploring the causes of heterogeneity. *Brain Behav Immun*. v.26, n.7, p. 1180-8,2012.
- HOWREN MB, LAMKIN DM, SULS J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*, [s.l: s.n.], p.171–86, 2009.
- JANKORD R, ZHANG R, et al. Stress activation of IL-6 neurons in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 299, n. 1, p.343–51, 2010.
- JIANG C et al. VEGF function in depression and antidepressant efficacy. *Mol Psychiatry*, n.7, p. 1632-1642, 2018.
- JIMÉNEZ, S. L.; Campa L; Auberson YP; Adell A. The role of GluN2A and GluN2B subunits on the effects of NMDA receptor antagonists in modeling schizophrenia and treating refractory depression. *Neuropsychopharmacology*, v. 39, n.11, p.2673-80, 2014.
- KAREGE, F. et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*, v. 57, n. 9, p. 1068-72, 2005.
- KENIS, G; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int. J. Neuropsychopharmacol*, v.5, 401–412, 2002.
- KISELYCZNYK, C. et al. NMDA receptor subunits and associated signaling molecules mediating antidepressant-related effects of NMDA-GluN2B antagonism. *Behav Brain Res*, v. 287, p. 89-95, 2015.
- KOO JW, DUMAN RS. IL-1 β is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci*, v. 105, n.2, p.751–756, 2008.
- KUBERA M, MAES M, HOLAN V, BASTA-KAIM A, ROMAN A, SHANI J. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-

inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subjected to the chronic mild stress model of depression. *Journal of Affective Disorders*, v. 63, n. 1–3, p.171–178, 2001.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: Behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology*, v. 214, n. 4, p. 819–828, 2011.

KUMAR, S.; MONDAL, A. C. Neuroprotective, Neurotrophic and Anti-oxidative Role of Bacopa monnieri on CUS Induced Model of Depression in Rat. *Neurochemical Research*, v. 41, n. 11, p. 3083–3094, 2016.

LARSEN B, LUNA B. Adolescence as a neurobiological critical period for the development of higher-order cognition. *Neurosci Biobehav Rev*. v.94, p. 179-195, 2018.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, v.53, p.597-652, 2001.

LEITE, C. P. Avaliação dos efeitos farmacológicos de (o-metil) -n-2-hidroxi-benzoil tiramina (riparina II) de Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos. [s.l.] *Universidade Federal do Ceará*, 2008.

LEMAY LG, VANDER AG, KLUGER M. Role of interleukin 6 in fever in rats. *J. Fisiol*. v.258, [s.n.], p.798-R803, 1990.

LEPPERT, W. Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. *Pharmacological reports*, v. 61 n.6, p.978–92, 2009.

LI N, LIU RJ, DWYER JM, BANASR M, LEE B, SON H, LI XY, AGHAJANIAN G, DUMAN RS. GlutamateN-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biological Psychiatry*. [s.l: s.n.], p.754–761, 2011.

LI, YAN-HAI et al. Postsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors contribute to long-term depression induction in medial vestibular nucleus neurons of juvenile rats. *Neuroscience letter*, v. 715, 2020.

LOBO-SILVA, D.; CARRICHE, G.M.; CASTRO, A.G.; ROQUE, S.; SARAIVA, M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J. Neuroinflamm*, v. 13, 297, 2016.

LOFTIS JM, HUCKANS M, MORASCO BJ. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol Dis*. v. 37, n. 3, p, 519-33, 2010.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. Brain-derived neurotrophic factor and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Clin Psychiatry*, v. 70, n. 12, p. 1662-6, 2009.

MAENG S, ZARATE CA, DU J, SCHLOESSER RJ, MCCAMMON J, CHEN G, MANJI HK. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biological Psychiatry*, v.69, p.349–352, 2008.

- MAES M, SONG C, LIN A-H, et al. Negative immunoregulatory effects of antidepressants inhibition of interferon- γ and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacology*, v. 20, n.4, p.370–379, 1999.
- MARCINKIEWCZ, C.A. & DEVINE, D.P., Modulation of OCT3 expression by stress, and antidepressant-like activity of decynium-22 in an animal model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, n.131, p.33–41, 2015.
- MATA, R. et al. Antimycobacterial compounds from Piper sanctum. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 12, p. 1961–1968, 2004.
- MCCLUNG, C. A. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacology Therapeutics*, v.114, p.222–232, 2007.
- MENTER A, AUGUSTIN M, SIGNOROVITCH J, YU AP, WU EQ, GUPTA SR et al. The effect of adalimumab on reducing depression symptoms in patients with moderate to severe psoriasis: a randomized clinical trial. *J Am Acad Dermatol*, [s.l: s.n.], p.812–8, 2010.
- MESQUITA AR, CORREIA-NEVES M, ROQUE S, et al. IL-10 modulates depressive-like behavior. *Journal of Psychiatric Research*, v. 43, n.2, p. 89–97, 2008.
- MIKOVA O, YAKIMOVA R, BOSMANS E, KENIS G, MAES M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *Eur Neuropsychopharmacol* v.11, n.3, p. 203–208, 2001.
- MILLER AH, MALETIC V, RAISON CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry*, v.65, n. 9 p.732–741, 2009.
- MILLER AH, RAISON CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*, v.16, n.1, p. 22–34, 2016.
- MILLER, O. H. et al. GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *Elife*, v. 3, p. e03581, 2014.
- MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brainderived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, v. 63, n. 1, p. 71-124, 2001.
- NEIS, V. B. et al. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. *European neuropsychopharmacology*, v. 26, n. 6, p. 959–71, 2016.
- NGAHA NJILA, M. I. et al. Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. *7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences*, p. 67–72, 2017.
- NODINE, J.H.; SIEGLER, P.E. *Animal and Clinical Pharmacologic Techniques in Drug Evaluation*, EUA, Year Book Medical Publishers Inc. p. 660, 1964.

NUNES, G. B. L., COSTA, L. M., GUTIERREZ, S. J. C., SATYAL, P., & DE FREITAS, R. M. Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. *Life Sciences*, v. 121, p. 57–64, 2015.

OGŁODEK E. Changes in the Serum Levels of Cytokines: IL-1 β , IL-4, IL-8 and IL-10 in Depression with and without posttraumatic stress disorder. *Brain Sci*, v.12, n.3, p.387, 2022.

OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.31, p.588-591, 2008.

PAPE, K.; TAMOUZA, R.; LEBOYER, M.; ZIPP, F. Immunoneuropsychiatry—Novel perspectives on brain disorders. *Nat. Rev. Neurol*, v. 15, 317–328, 2019.

PARNET P, KELLEY KW, BLUTHÉ RM, DANTZER RJ. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. *Neuroimmunol*, v. 125, n.1–2, p.5–14, 2002.

PENG, S. et al. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, v. 93, n. 6, p. 1412-21, 2005.

PERITO, M. E. S., & FORTUNATO, J. J. Biological markers of depression: a review on the expression of neurotrophic factors. *Rev Neurocienc*, v.20, n. 4, p.597-603, 2012.

PHILLIPS, C. Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection. *Neural Plasticity*, 2017.

PONG, S.F.; DEMUTH, S.M.; KINNEY, C.M.; DEEGAN, P. Prediction of human Analgesic dosages of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) from analgesic ED50 values in mice. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, v.273, p.212-220, 1985.

PRESKORN SH, BAKER B, KOLLURI S, MENNITI FS, KRAMS M, LANDEN JW. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 28, p. 631–637. 2008.

PRINHOLATO DA SILVA C, OLIVEIRA DD, BENINCASA BI, BARBAR B, FACCHIN AL, BELEBONI RO. Antidepressant activity of Riparin A in murine model. *Behav Pharmacol*, 2021 v.32, n.7, p. 599-606, 2021.

PRINS, J., OLIVIER, B. & KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, n.20, p. 1107–1130, 2011.

RANG, H. P. et al. Rang and Dale's Pharmacology. In: *Rang and Dale's Pharmacology*, [s.l: s.n.], p. 566, 2018.

- REICHENBERG A, YIRMIYA R, SCHULD A, KRAUS T, HAACK M, MORAG A et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry*, [s.l: s.n.], p. 445 – 52, 2001.
- ROQUE S, CORREIA-NEVES M, MESQUITA AR, PALHA JA, SOUSA N. Interleukin-10: a key cytokine in depression? *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, [s.l: s.n.], 2009.
- ROTHWELL NJ, LUHESHI GN. Interleukin 1 in the brain: Biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, v.23, n. 12, p. 618–625, 2000.
- SANTIAGO, R. F., DE BRITO et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. *Inflammation*, v.38, n.6, p. 2203–2215, 2015.
- SERNA, CLARA et al. Drugs related to the etiology of molar incisor hypomineralization: A systematic review. *Journal of the American Dental Association*, v. 147,2, 2016.
- SHIZUYA K, KOMORI T, et al. The influence of restraint stress on the expression of mRNAs for IL-6 and the IL-6 receptor in the hypothalamus and midbrain of the rat. *Life Sci*, v. 61, n.10, p. 135–40, 1997.
- SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. Method for evaluating both non–narcotic and narcotic analgesics. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and medicine*, v.95, p.729, 1957.
- SKOLNICK, P. et al. Effect of NMDAR antagonists in the tetrabenazine test for antidepressants: comparison with the tail suspension test. *Acta Neuropsychiatr*, v. 27, n. 4, p. 228-34, 2015.
- SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012.
- SONG C, HALBREICH U, HAN C, LEONARD BE, LUO H. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. *Pharmacopsychiatry* v. 42, p.182–8, 2009.
- SOUSA, F. C. F. DE et al. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 30, n. 7, p. 1212–6, 2007.
- SOUSA, F. C. F. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav*, v. 78, n. 1, p. 27–33, 2004.
- STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.
- TAKAKI A, HUANG QH, SOMOGYVÁRI-VIGH A., ARIMURA A. Immobilization stress can increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. *Neuroimmunomodulation*, [s.v], n. 1, p.335-342, 1994.

TAN P., et al. Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Therapy*, v. 12, p.59-66, 7 2004.

TENG, C.T.; DEMÉTRIO F.N. Psicofarmacologia Aplicada – Manejo prático dos Transtornos Mentais. *Atheneu*, 2ª edição, 2012.

THOMAS AJ, DAVIS S, MORRIS C, JACKSON E, HARRISON R, O'BRIEN JT. Increase in interleukin-1 beta in late-Life depression. *Am J Psychiatry*, v. 162, n.1, p.175-7, 2005.

TYRING S, GOTTLIEB A, PAPP K, GORDON K, LEONARDI C, WANG A et al. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet*, [s.l: s.n.], p.29–35, 2006.

UGALE, VINOD et al. GluN2B/N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists: Advances in Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation Studies. *CNS & neurological disorders drug targets*, v. 20, n.9, p. 822-862, 2021.

VACHER, P.J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A propos de Quelques produits usuels – comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Medicina Experimentalis*, v.11, p.51-58, 1964.

VALE, M.L. Atividade analgésica das interleucinas 4, 13 e 10 (IL-4, IL-13 e IL10) na dor inflamatória experimental: Papel de células residentes e citocinas. Dissertação de Mestrado em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2000.

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

VERMANI, M.; MARCUS, M.; KATZMAN, M. A. Rates of detection of mood and anxiety disorders in primary care: a descriptive, cross-sectional study. *The primary care companion for CNS disorders*, v. 13, n. 2, p. 1–10, 2011.

VERRI JR, W.A.J.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for Analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*, v.112, p.116-138, 2006.

VIGO, D. et al. Estimating the true global burden of mental illness. *The Lancet Psychiatry*, v. 3, n. 2, p. 171–178, 2016.

WARNER-SCHMIDT JL, DUMAN RS. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc. Nacional Acad. Sci*, 2007; p. 104 :4647–4652, 2007.

WATKINS LR, HANSEN MK, NGUYEN KT, LEE JE, MAIER SF. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β : Molecular biology for non-molecular biologists. *Life Sci*, v. 65, n. 5, p.449–481, 1999.

WHO, W. H. O. Suicide worldwide in 2019: global health estimates? Geneva: *World Health Organization*, 2021.

- WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: history, evaluation, and use. *Neurobiology of Stress*, n.6, [s.v], p.78 – 93, 2017.
- YANG, T., NIE, Z., SHU, H., KUANG, Y., CHEN, X., CHENG, J., YU, S., & LIU H. The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression. *Front Cell Neurosci*. v.82. n.14. 2020.
- YAO JH, YE SM, BURGESS W, ZACHARY JF, KELLEY KW, JOHNSON RW. Mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme resist anorexia induced by central lipopolysaccharide. *Am J Physiol*, v.277, [s.n.], p.1435–1443, 1999.
- YOHN, CHRISTINE N et al. The role of 5-HT receptors in depression. *Molecular brain*, v. 10, p. 28, 2017.
- ZAKARIA, Z.A., ABDUL, Z.D.G., RADEN, R.N.M.N., GOPALAN, H.K., SULAIMAN, M.R., ABDULLAH, F.C. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Dicranopteris linearis* leaves chloroform extract in experimental animals. *Yakugaku Zasshi*, v.126, p.1197-1203, 2006b.
- ZAKARIA, Z.A., GOPALAN, H.K., ZAINAL, H., MOHD POJAN, N.H., MORSID, N.A., ARIS, A. et al. Antinociceptive, antiinflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* Chloroform extract in animal models. *Yakugaku Zasshi*, v.126, p.1171-1178, 2006a.