



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITOS DE VAR01 SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO  
INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS.**

**Felype da Silva Pereira**

Belém-PA

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITOS DE VAR01 SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO  
INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS.**

**Autor: Felype da Silva Pereira**

**Orientador: Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém-PA  
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

P436e Pereira, Felype da Silva.  
Efeitos do var01 sobre o comportamento do tipo  
depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos /  
Felype da Silva Pereira. — 2020.  
xvii, 64 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Eneas de Andrade Fontes Junior  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2020.

1. comportamento depressivo. 2. plantas medicinais.  
3. lipopolissacarídeo. I. Título.

CDD 615.538

---

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Felype da Silva Pereira

### **EFEITOS DE VAR01 SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

---

Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

---

Profa. Dra. Luana Fernandes  
Membro externo

Belém-PA

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus por sua presença sempre viva nos pequenos detalhes em minha vida. Aos meus pais que são minha grande motivação para seguir em frente e a todos que verdadeiramente torcem por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Não poderia começar meus agradecimentos, senão com a minha eterna gratidão a Deus por ter plantado em meu coração o desejo de seguir minha vida acadêmica, por ter colocado anjos na minha caminhada e por ter me guiado em todos os passos até chegar a esse momento.

Gratidão os meus pais Raimundo Gomes e Maria Roseli. Não sei como retribuir tamanho amor, carinho, admiração e força que me deram desde a minha adolescência quando disse a vocês que queria fazer uma faculdade e em meio a todas as dificuldades, distâncias e saudades, conseguimos realizar esse grande sonho de ser graduado em Farmácia e agora Mestre. Obrigado por serem os melhores pais que eu poderia ter.

Aos meus irmãos que mesmo não entendendo muito bem onde eu queria chegar, souberam me ajudar indiretamente para que esse momento se concretizasse. Essa vitória também é de vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Enéas Fontes, que me acolheu como orientando, aceitou fazer parte dessa aventura científica comigo e com muita sabedoria, calma, mansidão, me ensinou a acreditar mais em mim, me ensinou a ter mais disciplina, me ensinou a ter um olhar mais humano. Obrigado por ser esse grande homem.

Aos meus amigos queridos do LAFICO que me acolheram como uma família e tornaram dias difíceis em grandes momentos de alegria. Essa vitória é nossa meus amigos. Vocês possuem um lugar na memória e no coração que ninguém jamais vai tirar.

Ao meu companheiro, Pedro Câmara. Obrigado por todo apoio nessa jornada. Obrigado pelo ombro para chorar e pelas vitórias comemoradas. Obrigado por compartilhar esse sonho junto comigo.

A todos amigos, familiares, colegas de trabalho, que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Minha eterna gratidão a todos vocês.

**“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.**

**(George Bernard Shaw)**

## LISTA DE ABREVIATÓES E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ADM	Administração
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE	Barreira Hematoencefálica
BRC	Grupo controle
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
DA	Dopamina
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EALVm	Extrato Aquoso Liofilizado de <i>Varronia multispicata</i>
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FLX	Cloridrato de Fluoxetina
GC	Glicocorticóides
GLUT	Glutamato
GLuN1	Subunidade 1 do receptor de NMDA
GLuN2	Subunidade 2 do receptor de NMDA
GPS	Global Positioning System
HPA	Hipotálamo- Hipófise- Adrenal
I.P.	Intraperitoneal
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
LBP	Proteína Ligadora de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
MD-2	Proteína Diferenciada 2
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NET	Receptor de Noradrenalina
NFKB	Fator Nuclear Kappa B



OMS	Organização Mundial de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
SERT	Receptor de Serotonina
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TLR4	Receptor Tool-like 4
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
V.O.	Via Oral
VAR01	<i>Varronia multispicata</i>
5-HT	Serotonina

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> DOENÇAS E TRANSTORNOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO NEUROINFLAMATÓRIO COM ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS. FONTE: AUTOR .....	21
FIGURA 2 - A) DESENHO ESQUEMÁTICO DO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS). A: ANTÍGENO O; B: CORE DO POLISSACARÍDEO; C: GLICOSAMINA FOSFORILADA; D: ÁCIDOS GRAXOS; E: LIPÍDEO A. FONTE: AUTOR. B) ESTRUTURA QUÍMICA DO LIPOPOLISSACARÍDEO. FONTE: RAETZ ET AL (2006).....	22
FIGURA 3 - VIA CLÁSSICA DA ATIVAÇÃO DOS RECPTORES POR LPS E A ATIVAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DO NFKB E DE OUTROS FATORES DE TRANSCRIÇÃO. FONTE: CRUZ-MACHADO (2010) .....	23
FIGURA 4 - ARRONIA MULTISPICATA. A: ILUSTRAÇÃO DA ESPÉCIE. FONTE: MARTIUS ET AL. (1987). B E C: FLORESCÊNCIA E FOLHAS. FONTE: HERBÁRIO UFP (2010) ...	29
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE VARONIA MULTISPICATA (VAR01). FONTE: AUTOR.....	31
FIGURA 6 - DESENHO EXPERIMENTAL DO MODELO DE COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO INDUZIDO POR LPS ESTUDADO. FONTE: AUTOR. ....	34
FIGURA 7 - ARENA DO CAMPO ABERTO. FONTE: AUTOR .....	35
FIGURA 8 - MOVIMENTOS DE AUTOLIMPEZA (GROOMING) INICIADO A PARTIR DA PULVERIZAÇÃO DE SACAROSE 10% NO DORSO DE RATOS. NA SEQUÊNCIA, OBSERVAM-SE MOVIMENTOS SIMÉTRICOS EM FORMA DE ELIPSE AO REDOR DO NARIZ; MOVIMENTOS UNILATERAIS ENVOLVENDO UMA PATA, QUE ALCANÇAM ATÉ AS VIBRISSAS; MOVIMENTOS AMPLOS BILATERAIS FEITOS SIMULTANEAMENTE; E MOVIMENTOS PROLONGADOS DE AUTOLIMPEZA DO CORPO. FONTE: ADAPTADO DE BERRIDGE ET AL (2015) .....	36
FIGURA 9 - TESTE DO NADO FORÇADO. FONTE: MIND THE GRAPH (2019) .....	37
FIGURA 10 – EFEITO DO VAR01 SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA DE RATOS NO CAPO ABERTO, NO CONTEXTO DO COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO INDUZIDO POR LPS. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N=8 ANIMAIS/GRUPO) DA DISTÂNCIA TOTAL PERCORRIDA DURANTE 300 S	

EM METROS. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDO DO POST HOC DE TUKEY. ONDE \*\*P<  
0,01 E \*\*\*P<0,001.....38

FIGURA 12 - EFEITO DO VAR01 SOBRE A ATIVIDADE NO TEMPO DE FREEZING EM RATOS NO CONTEXTO DO COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO INDUZIDO POR LPS NO CAMPO ABERTO. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N=8 ANIMAIS/GRUPO) DO COMPORTAMENTO APRESENTADO DURANTE 300 S. *P <0,05 VERSUS GRUPO LPS. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDO DO POST HOC DE HOLME-SIDAK. ....	39
FIGURA 13 – EFEITOS DO VAR01 SOBRE O COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA NO CONTEXTO DO COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO INDUZIDO POR LPS EM RATOS NO SPLASH TEST. DADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N=8/GRUPO) DO TEMPO DE GROOMING APRESENTADO NO INTERVALO 5 MINUTOS. ***P<0,001 VERSUS GRUPO LPS. ANOVA DE UMA VIA SEGUIDO DO POST HOC DE HOLME-SIDAK. ....	40
FIGURA 14 – EFEITO DO VAR01 SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DO NADO FORÇADO EM ANIMAIS TRATADOS COM VAR01 COMPARADO AO GRUPO CONTROLE LPS NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR LPS. OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N=8/ GRUPO) DO NÚMERO DE GROOMINGS. CALCULADOS POR ANOVA DE UMA VIA SEGUIDO DO POST HOC DE TUKEY, ONDE ***P<0,001 .....	41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
---	----

## RESUMO

PEREIRA, F.S. efeitos de VAR01 sobre o comportamento do tipo depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020. 64p.

O Transtorno Depressivo Maior é uma doença neuropsiquiátrica grave e debilitante, caracterizada por humor deprimido, diminuição de interesses e comprometimento da função cognitiva, que acomete cerca de 6 % da população mundial. Apesar de dispor diversos medicamentos para seu tratamento, são todos direcionados a modulação do componente monoaminérgico atribuído a sua patogenia. Tais medicamentos apresentam demora na geração de benefícios clínicos, havendo frequentemente sintomas residuais permanentes. A busca por agentes terapêuticos inovadores mais seguros e eficazes tem sido um importante foco da pesquisa farmacológica, abordando outros componentes fisiopatológicos, como a neuroinflamação. As plantas medicinais, relevante fonte de moléculas com potencial terapêutico, têm sido amplamente investigadas. Diante disso, o presente projeto se propõe a avaliar a atividade do extrato aquoso liofilizado de *Varronia multispicata* (VAR01), sobre o comportamento do tipo depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos. Para isto, 32 ratos (*Rattus norvegicus*) wistar, divididos em 4 grupos (n=8/grupo): BRANCO; LPS; VAR01 e padrão (FLX), foram tratados oralmente (gavagem) com salina (0,9%), salina (0,9%), VAR01 (150 mg/kg) e Fluoxetina (20 mg/kg), respectivamente, a cada 24 horas, por 6 dias. Trinta minutos após a última administração oral, receberam salina 0,9% (BRANCO) ou LPS (LPS, VAR01 e FLX) por via intraperitoneal. Após 24 h, foram submetidos a avaliação comportamental através dos testes do Campo Aberto, *splash test* e Nado Forçado. Os resultados demonstram pela primeira vez que o VAR01 é capaz de reduzir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, não promove alteração motora no campo aberto e aumenta o tempo de grooming no splash test. Tais achados são indicativos, de que o VAR01 é capaz de reduzir o comportamento tipo depressivos associado a um processo neuroinflamatório.

Palavras-chave: Plantas Medicinais; Varronia; Lipopolissacarídeo; Depressão.

## ABSTRACT

PEREIRA, F.S. effects of VAR01 on lipopolysaccharide-induced depressive behavior (LPS) in rats. Master's Dissertation, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2020. 64p.

Major Depressive Disorder is a severe and debilitating neuropsychiatric disease, characterized by depressed mood, decreased interests and impaired cognitive function, which affects about 6% of the world population. Despite having several medications for their treatment, they are all aimed at modulating the monoaminergic component attributed to its pathogenesis. Such drugs have a delay in generating clinical benefits, and there are often permanent residual symptoms. The search for safer and more effective innovative therapeutic agents has been an important focus of pharmacological research, addressing other pathophysiological components, such as neuroinflammation. Medicinal plants, a relevant source of molecules with therapeutic potential, have been extensively investigated. Therefore, this project aims to evaluate the activity of the freeze-dried aqueous extract of *Varronia multispicata* (VAR01), on the behavior of the depressive type induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats. For this, 32 rats (*Rattus norvegicus*) wistar, divided into 4 groups (n = 8 / group): WHITE; LPS; VAR01 and standard (FLX), were treated orally (gavage) with saline (0.9%), saline (0.9%), VAR01 (150 mg / kg) and Fluoxetine (20 mg / kg), respectively, each 24 hours, for 6 days. Thirty minutes after the last oral administration, they received 0.9% saline (WHITE) or LPS (LPS, VAR01 and FLX) intraperitoneally. After 24 h, they were submitted to behavioral evaluation through the tests of the Open Field, splash test and Forced Swimming. The results demonstrate for the first time that VAR01 is able to reduce the immobility time in the forced swim test, does not promote motor alteration in the open field and increases the grooming time in the splash test. Such findings are indicative that VAR01 is capable of reducing depressive behavior associated with a neuroinflammatory process.

Keywords: Medicinal Plants; *Varronia*; lipopolysaccharide; Depression.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Depressão.....	16
1.2	fisioPATOlOgia da depressão.....	17
1.2.1	Hipótese Monoaminérgica.....	17
1.2.2	Hipótese Neuroendócrina.....	19
1.2.3	Hipótese Glutamatérgica.....	20
1.2.4	Hipótese Neuroinflamatória.....	21
1.3	Lipopolissacarídeo.....	22
1.3.1	LPS como agente indutor de neuroinflamação em modelo de comportamento depressivo.....	23
1.3.2	LPS e a hipótese neuroinflamatória.....	24
1.4	Plantas medicinais como fonte de novos agentes terapêuticos	25
1.5	Varronia multispicata.....	26
1.5.1	Aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos.....	26
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Geral.....	30
2.2	Específicos.....	30
3	METODOLOGIA.....	31
3.1	Coleta e identificação do material botânico.....	31
3.2	Preparação do EXTRATO.....	31
3.4	Drogas.....	32
3.5	Animais.....	32
3.6	Modelo de Neuroinflamação.....	33
3.3	AVALIAÇÃO Comportamental.....	34
3.3.1	Teste do campo aberto ( <i>open field</i> ).....	34



3.3.2	Teste de borrifagem de sacarose ( <i>splash test</i> ) .....	36
3.3.3	Teste do nado forçado ( <i>forced swimming test</i> ) .....	36
3.4	Eutanásia .....	37
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	38
4.1.1	Efeito do VAR01 sobre a atividade locomotora total no teste do Campo Aberto.....	38
4.1.2	Efeito de VAR01 sobre o tempo de <i>Freezing</i> no teste do Open Field	39
4.1.3	Efeito do VAR01 sobre o comportamento de autolimpeza ( <i>grooming</i> ) - <i>Splash test</i> .....	39
4.1.4	Efeito do VAR01 sobre o tempo de imobilidade no nado forçado	40
5	DISCUSSÃO .....	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
7	REFERÊNCIAS .....	49
	ANEXO – parecer do CEPAE UFPA.....	62

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença neuropsiquiátrica, grave e debilitante, com alterações a nível celular e molecular. É a mais comum das patologias psiquiátricas, caracterizada por humor deprimido, diminuição de interesses, comprometimento da função cognitiva, déficit psicomotor e sintomas vegetativos, como distúrbios do sono ou apetite. O TDM pode apresentar uma hereditariedade de aproximadamente 35% (WANG et al., 2015; FAKHOURY, 2016 ; OTTE et al., 2016 ; SHADRINA et al., 2018; SUH et al., 2019). Apesar de tais fatores genéticos e biológicos, que contribuem para essa condição, o perfil socioeconômico, influência cultural e social, exercem papel fundamental para a deflagração da depressão (KESSLER, 2013; KANG, et al 2018).

Sua prevalência global é de aproximadamente 6 %, destacando-se sua propensão à recorrência e cronicidade, que o torna um grande problema de saúde pública em escala mundial (MALHI e MANN, 2018; KANG, et al., 2018). A doença se manifesta principalmente na transição da adolescência para a vida adulta, sendo o primeiro episódio depressivo apresentado antes dos 20 anos em cerca de 40% dos indivíduos (MALHI e MANN, 2018), aumentando a probabilidade do surgimento de doenças crônicas seguido da não realização do tratamento ao longo da vida (DEAN, et al., 2017). Devido a esse padrão de manifestação, a depressão impacta negativamente em contextos cruciais para o desenvolvimento pessoal, como no período escolar e desenvolvimento laboral, comprometendo seu desenvolvimento e inserção social (MATSUO, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que em até 2030, o transtorno depressivo seja o principal contribuinte para a carga global de doenças (WHO, 2008).

As características observadas no comportamento desses indivíduos, são acompanhadas de variações em aspectos clínicos com evidências de alterações morfofuncionais do encéfalo, com afinamento cortical em várias regiões, incluindo lobo frontal, lobo temporal, hipocampo, córtex pré-frontal, córtex

cingulado anterior, córtex órbito-frontal, hipotálamo e corpo estriado (COFFEY, 1993; KUMAR, 2002; SUH, et al., 2019; BOKU, et., 2017). Além dessas alterações macroscópicas, várias mudanças neurobiológicas e moleculares foram identificadas e sustentam as hipóteses da fisiopatologia do TDM.

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO

Apesar do crescente impacto que o TDM gera em todo o mundo, sua fisiopatologia ainda permanece incerta. Várias hipóteses foram propostas para sua origem e fisiopatologia, com frequência associada à compreensão do modo de ação dos fármacos antidepressivos (BOKU et., 2017). Partindo da teoria da depleção monoaminérgica, atualmente são também exploradas a resistência de receptores de glicocorticóides, a teoria glutamatérgica e a teoria neuroinflamatória (PAUL-SAVOIE et al., 2011; HAROON et al., 2012; ALBERT, 2012). A terapêutica farmacológica do TDM, no entanto, ainda é centrado basicamente na modulação da transmissão sináptica monoaminérgica (FAKHOURY, 2016).

### 1.2.1 Hipótese Monoaminérgica

A hipótese monoaminérgica é a mais comum na tentativa de esclarecer a fisiopatologia da depressão e está baseada nas evidências de que as concentrações de monoaminas como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA) estão diminuídas na fenda sináptica, no contexto depressivo (BOKU et al., 2018; FAKHOURY et al., 2016; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ et al., 2012; SANACORA et al., 2009), sendo reforçada pelo fato de a maioria dos fármacos antidepressivos terem como alvo componentes monoaminérgicos.

Uma variante dessa teoria, a teoria serotoninérgica afirma que uma redução nos níveis de 5-HT aumenta os riscos de desenvolver um estado depressivo e dentre as monoaminas, tem sido uma das mais estudadas na

tentativa de desenvolver novas estratégias, dada a eficácia dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), além de serem os antidepressivos mais prescritos (MANSARI, et al., 2010; BOOIJ et al., 2002).

Entre os achados que dão suporte à teoria serotoninérgica está a evidência de baixos níveis de 5-HT plaquetário em pacientes depressivos, antes de iniciar o tratamento com ISRS. Isso foi também observado naqueles não responsivos ao tratamento com Paroxetina (Maurer-Spurej, 2007). Adicionalmente, tem sido demonstrada a depleção dos níveis plasmáticos de L-triptofano, precursor de 5-HT, associado a ocorrência de sintomas depressivos em 50-60% dos indivíduos (Booij et al., 2002; BOOIJ et al., 2005).

Os ISRS apresentam seletividade para o circuito serotoninérgico. A Fluoxetina (FLX) foi o primeiro fármaco pertencente a classe e foi introduzido na clínica para pacientes depressivos e outras doenças e transtornos mentais (WONG, et al., 1995). Desde então, a FLX começou a ser utilizada como padrão ouro em modelos de comportamento do tipo depressivo (FERNANDES E GUPTA, 2019; LU et al., 2017; ZHANG et al., 2012; MORAES et al., 2017).

A modulação do humor no estado depressivo promovida pela NA está concentrada na atividade dos receptores inibitórios  $\alpha_2$ - pré- sináptico. Esses receptores em desarmonia, promovem uma desregulação do tônus noradrenérgico, desencadeando o quadro depressivo (SALGADO et al., 2012). Esse dado é confirmado quando Gonzalez-Maeso (2002) evidencia que pacientes com depressão que cometeram suicídio apresentam maior densidade desses receptores do que o grupo controle, sugerindo o envolvimento dos receptores de NA (NET) na fisiopatologia da depressão. A DA é um neurotransmissor que está relacionado com modulações da concentração, capacidade de sentir prazer, motivação, velocidade psicomotora, nos circuitos neurais do SNC. Alterações nos níveis de DA disponíveis na fenda sináptica, compromete funções neurais influenciando a deflagração dos sintomas da depressão, em partes, reguladas pela DA (DUNLOP E NEMEROFF, 2007).

Essa disfunção dopaminérgica, por muitas vezes, foi negligenciada e ofuscada por pesquisas que focaram em demasia nos circuitos neurais contendo 5-HT e NA (BOKU et al., 2018; FAKHOURY et al., 2016; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ

et al., 2012; SANACORA et al., 2009), contribuindo dessa forma para evidenciar que a teoria monoaminérgica se mostra simplista para esclarecer o transtorno depressivo em sua totalidade (MANSARI et al., 2010).

Embora NA e DA exerçam papel chave nessa hipótese, a concentração das evidências sobre o sistema serotoninérgico e a eficácia de ISRS, ganharam grande destaque na terapêutica antidepressiva por induzirem um aumento do nível de 5-HT na fenda sináptica por meio da inibição da recaptação nos neurônios pré-sinápticos exercida pelo receptor pré-sináptico SERT, mantendo os níveis da neurotransmissão e conseqüentemente alterando positivamente o humor depressivo (MANSARI, et al., 2010) No entanto, sintomas residuais como comprometimento da motivação, concentração e prazer podem permanecer por estarem relacionados às concentrações de DA não somente a fármacos monoaminérgicos convencionais (DUNLOP e NEMEROFF, 2007).

## **1.2.2 Hipótese Neuroendócrina**

O estresse é classicamente conhecido por interferir na regulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA). Quando um agente estimulador do estresse como o Lipopolissacarídeo (LPS), ativa o eixo HPA através dos neurônios do núcleo paraventricular, o hipotálamo é estimulado para liberar o Fator Liberador de Corticotrofina (CRF). Após ativação, o CRF promove a ativação do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) na adenohipófise por meio da circulação hipotálamo-hipofisária (BOKU et al., 2018).

O ACTH segue para a circulação sistêmica para exercer seus efeitos na porção cortical da glândula adrenal para que sejam produzidos os glicocorticóides (GC), elevando os níveis de GC no sangue e no líquido cefalorraquidiano. Os níveis elevados de GC suprimem a liberação de CRF no hipotálamo realizando o *feedback negativo* do eixo HPA que depende da integridade do hipocampo, região altamente sensível ao estresse (KENDLER et al., 1999; KALINCHUK, 2010; BOKU et al., 2018).

No entanto, o TDM promove um bloqueio do *feedback negativo* do eixo HPA, permitindo com que os níveis de GC permaneçam elevados. Com isso, o estresse pode promover uma atrofia cerebral especificamente do hipocampo, córtex e amígdala além da diminuição da sensibilidade dos receptores de GC, regiões que exercem papel chave na fisiopatologia da depressão (MACQUEEN, 2003; BOKU et al., 2018).

### 1.2.3 Hipótese Glutamatérgica

Deficiências do sistema glutamatérgico tem sido abordado em estudos pré-clínicos e clínicos em indivíduos, como agente deflagrador do transtorno depressivo (LENER et al., 2017; BERMAN, et al., 2000). Esses estudos tem focado na busca de novos agentes terapêuticos que possam suprir a necessidade resultante da não eficiência dos fármacos que atuam no sistema monoaminérgico (GERHARD, et al., 2016).

Um dos primeiros fármacos a atuar com um antagonista não competitivo dos receptores N- Metil –D- Aspartato (NMDA) glutamatérgicos foi a cetamina, apresentando um efeito antidepressivo em torno de 24 horas com uma dose única intravenosa, permanecendo por um tempo significativo de 2 semanas, contrapondo os ISRS que apresentam variação de eficácia de 2 a 4 semanas, porém, a cetamina apresentou remissão dos sintomas em tempo semelhante aos de sua eficiência (NICIU et al., 2015; GARCIA et al., 2008).

A carência de antidepressivos com intervenções que abordem diretamente alvos subjacentes ao circuito monoaminérgico, reforça uma compreensão mais concreta da fisiologia dos receptores do tipo NMDA que são uma peça chave para compreender quais alvos podem ser atingidos na busca de antidepressivos mais eficientes (BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2003).

NMDA é composto por um tetrâmero com duas subunidades GluN1 e duas GluN2 que regulam influxo de cálcio e sódio e efluxo de potássio e que possuem em suas subunidades canal mediado por ligantes e canal mediado por voltagem. Além do mais, esses receptores apresentam um transbordamento

extra-sináptico, como liberação de glutamato (GLUT) pelas células gliais, tornando a regulação dessa via mais rica e complexa (PAPOUIN, et al., 2012).

### 1.2.4 Hipótese Neuroinflamatória

Evidências mais recentes sugerem que o processo inflamatório no Sistema Nervoso Central (SNC) ou comumente chamado de neuroinflamação, é uma hipótese a ser considerada para doenças e transtornos do sistema nervoso central como observado na figura 1. Essa hipótese se fundamenta na reatividade de células microgлияis, células astrocitárias e oligodendrócitos, além de uma expressiva redução da neurogênese hipocampal (TROUBAT et al., 2020; GIRIDHARAN, et al., 2019; YIRMIYA et al., 2015; CARLESSI et al., 2019).

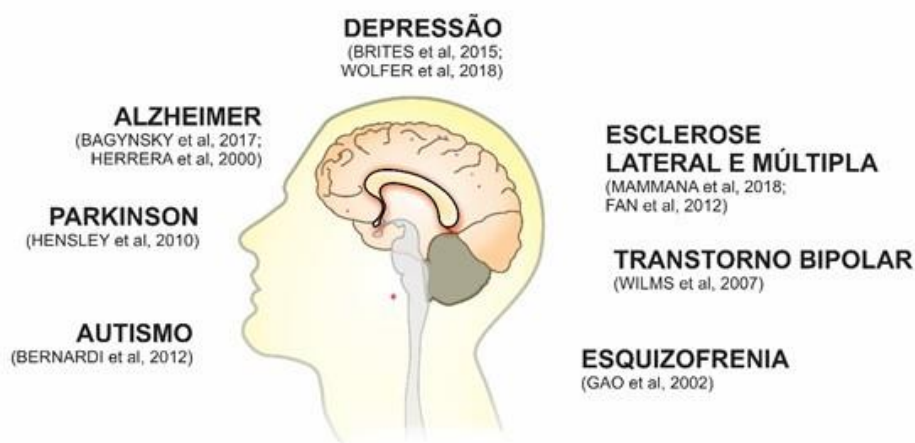


Figura 1 doenças e transtornos envolvidos no processo neuroinflamatório com estimulação de células gliais. fonte: autor

As células gliais desempenham funções estruturais e homeostáticas no SNC. Mais recentemente descobriu-se que elas também possuem importante função imunológica. Para tanto, quando estimuladas, assumem morfologia e atividade diferenciadas, tornando-se fonte e alvo de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Apesar de sua função protetora, dependendo da modalidade, persistência e intensidade da agressão, a resposta neuroinflamatória pode acarretar prejuízos ao SNC, favorecendo mecanismos

de morte celular ou ainda pela indução da produção de espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) e Espécie Reativas de Nitrogênio (ERN). Este processo ainda tem a capacidade de alterar a permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE), permitindo, portanto, a migração de leucócitos, citocinas e TNF- $\alpha$  da periferia para a região do encéfalo (CUSTÓDIO et al, 2013; O'CALLAGHAN, 2008).

### 1.3 LIPOPOLISSACARÍDEO

O lipopolissacarídeo (LPS), componente principal da parede celular de bactérias gram-negativas, está relacionado com a maioria dos distúrbios fisiopatológicos em infecções por gram-negativas (RIESTHCHEL et al, 1994; TUIN et al, 2006). O LPS possui na sua porção mais interna o lipídeo A, além de um polissacarídeo formado por um núcleo (*core*) e antígeno O, formado por vários terminais de séries repetidas de sacarídeos.

O lipídeo A é um glicolipídeo responsável pela toxicidade da molécula, sendo composto por unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada ligadas a vários ácidos graxos de cadeia longa, que variam de acordo com a espécie bacteriana. O *core* do polissacarídeo é semelhante entre todas as espécies que apresentam o LPS, no entanto, cada espécie apresenta unidades de repetições do antígeno O diferentes (Figura 2) (BROOKS, 2000; SCHUSTER, 1982).

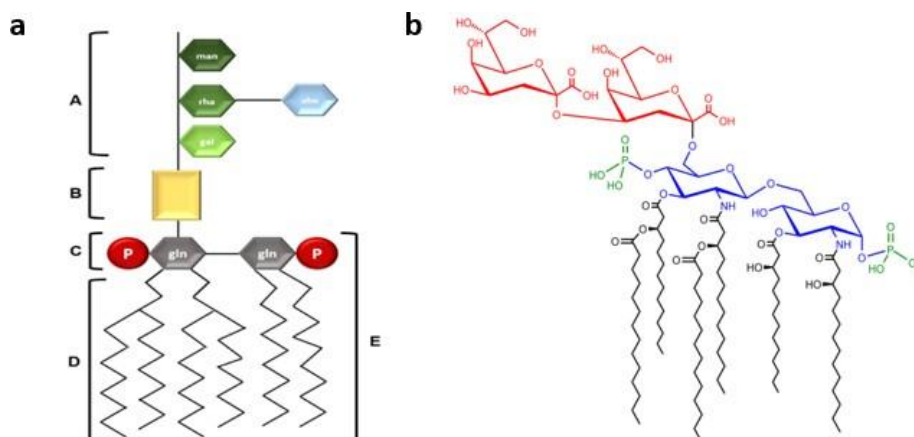


Figura 2 - a) desenho esquemático do lipopolissacarídeo (LPS). A: antígeno O; B: core do polissacarídeo; C: glicosamina fosforilada; D: ácidos graxos; E: lipídeo A. Fonte: autor. b) estrutura química do lipopolissacarídeo. Fonte: RAETZ et al (2006).



O LPS promove sua ação através dos receptores Toll-Like, com especial atenção ao tipo 4 (TLR4). O reconhecimento do LPS é mediado por outras moléculas como a proteína ligante do LPS (LBP) do inglês, (Lipopolysaccharide Binding Protein), a proteína CD14 e proteína Mielóide Diferenciadora 2 (MD-2). O complexo formado por essas proteínas, é dito como a principal forma de reconhecimento do LPS. A ativação dos receptores TLR4 desencadeia diversas vias de sinalização, sendo a via do Fator Nuclear Kappa B (NFkB) a principal. Uma vez ativado, NFkB migra para o núcleo, promovendo a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos, além de vias como MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*), AP-1 (*activator protein 1*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*) IRF3 (interferon (IFN)-regulatory factor 3) entre outras (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

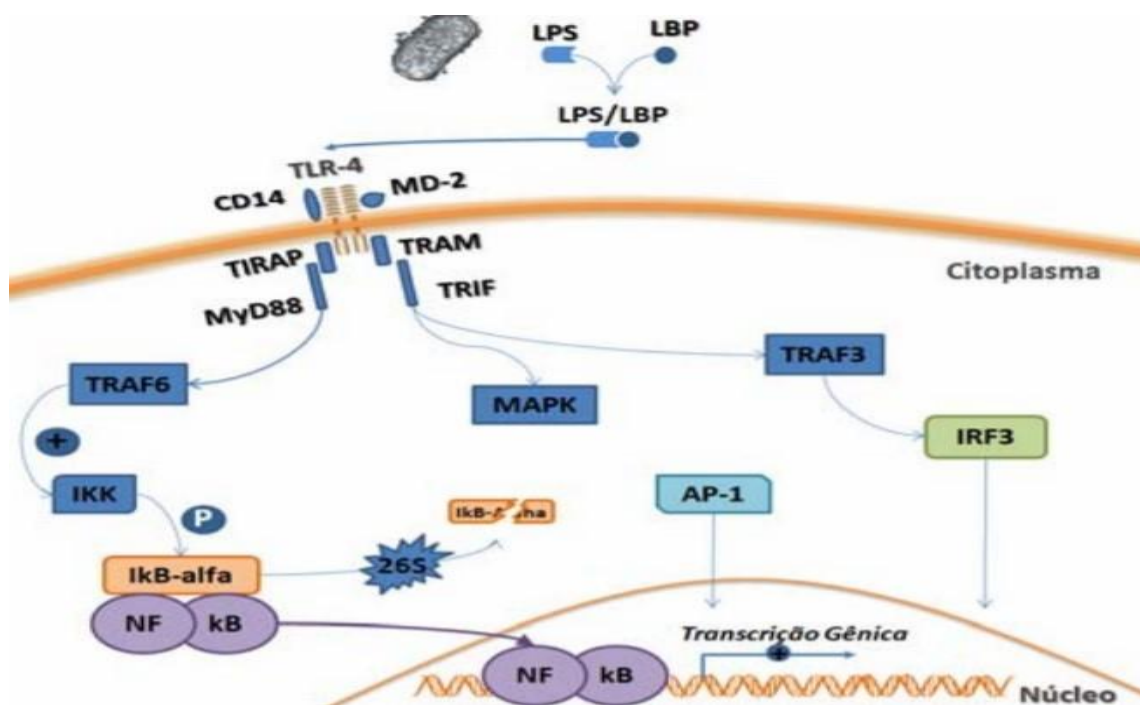


Figura 3 - via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFkB e de outros fatores de transcrição. fonte: Cruz-Machado (2010)

### 1.3.1 LPS como agente indutor de neuroinflamação em modelo de comportamento depressivo

O LPS, como o maior fator de virulência das bactérias gram-negativas, não é facilmente neutralizado por anticorpos, dada a carência de especificidade.

Esta endotoxina é capaz de ativar as células da cascata do complemento, envolvendo mediadores inflamatórios, ativação plaquetária, mastocitária e endotelial (LANGHANS, 1996), além de induzir os macrófagos a secretarem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico, interferons e prostaglandinas (DANTZER et al, 2001).

Ao ser administrado por via sistêmica ou intracerebral, o LPS induz a ativação microglial, elevando a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Em resposta a expressão de citocinas, induz de forma dose-dependente, febre, anorexia, redução global na atividade exploratória, diminuição da interação social e prejuízos comportamentais (BERG et al., 2004; DANTZER et al., 2001).

Junto a resposta celular e liberação de citocinas, o comportamento do tipo depressivo no modelo neuroinflamatório induzido pelo LPS, também é marcado pela indução de enzimas pró-inflamatórias, como a isoforma 2 da ciclooxigenase (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e elevação da produção de ERO's e ERN's, além da redução da produção de neurotrofinas como o BDNF (SABEDRA-SOUSA et al, 2018).

A partir destas propriedades, o LPS tem sido utilizado como agente neuroflogístico, proporcionando um modelo experimental neuroinflamação associada a transtornos mentais (THIBEAULT et al, 2001; RIVEST et al, 2003). Vários grupos de pesquisa envolvidos em elucidar mecanismos neuroinflamatórios presentes nas doenças e transtornos do SNC, tem utilizado o LPS como agente indutor de neuroinflamação em modelos de depressão (ZHANG et al, 2012; ZHU, 2014; LEE, 2018; JIANG, 2017; SABEDRA-SOUSA et al, 2018; BERKIKS et al, 2018).

### **1.3.2 LPS e a hipótese neuroinflamatória**

O Sistema Nervoso Central (SNC) relaciona-se com o sistema imune pelos sistemas nervoso autônomo e neuroendócrino. Além disso, mudanças no sistema imune, como estresse, podem afetar diretamente o SNC, aumentando o risco de desenvolver alterações emocionais como ansiedade e depressão (JEON e KIM, 2016; WEBER *et al.*, 2017).

A presença elevada de citocinas pro-inflamatórias no fluido cerebrospinal de pacientes com depressão tem sido amplamente demonstrada (LEVINE et al, 1999), havendo também fortes evidências associando a ativação microglial (SETIAWAN et al, 2015) e astrocitária nestas alterações comportamentais. Yun et al, (2018) demonstrou que a inibição astrocitária reduz o comportamento tipo depressivo induzido pelo LPS.

Experimentalmente observa-se a manifestação de comportamento do tipo depressivo, como é o caso do aumento do tempo de imobilidade em ratos no teste do nado forçado após administração aguda ou crônica de LPS (RODRIGUES et al, 2018; ZHANG et al, 2018), assim como na neuroinflamação induzida por estresse (YU et al, 2018; FERNANDES e GUPTA, 2019).

Além do comportamento do tipo depressivo, o modelo de neuroinflamação induzida por LPS também é marcado pela manifestação de comportamento do tipo ansioso, prejuízos cognitivos e de aprendizado em ratos, prejudicando ainda a coordenação motora (ZHAO et al, 2009; SABREDRA-SOUSA et al,2018; LEE et al, 2018).

#### 1.4 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS

Desde a Antiguidade, os seres humanos mantêm uma relação de dependência com a natureza, sendo ela a principal fonte de suprimento de suas demandas, como alimentos, moradia, lazer e remédios. As primeiras evidências acerca do manejo de plantas para fins medicinais são datadas em 2.600 a.C. na região da Mesopotâmia, conservado sua relevância até os dias de hoje (DAR et al, 2017).

Mesmo diante de todo o desenvolvimento tecnológico, os produtos naturais ainda constituem o mais importante celeiro de moléculas bioativas. Apesar do deslumbramento com o desenvolvimento industrial no início do século XX, os últimos 30 anos tem sido marcado pelo crescente resgate do interesse no uso de plantas medicinais, quer seja para a seleção de moléculas com potencial farmacológico ou para o desenvolvimento de fitoterápicos e preparação

artesanais com validação técnica e científica (DAR et al, 2017; GONULALAN et al, 2019).

Estima-se que mais de 80% da população de países em desenvolvimento fazem uso de plantas para fins terapêuticos. Isso se deve principalmente à forte herança cultural destes povos (SHANLEY et al, 2015); à substituição parcial de drogas pelas terapias envolvendo extratos vegetais, uma vez que são economicamente mais acessíveis; e à preocupação pelos efeitos adversos ocasionados pelos medicamentos industrializados (SKALLI et al, 2019).

O proveito de extratos vegetais na clínica pode ser evidenciado em diversos estudos, como conduzido por Karim (2018), que demonstrou efeito do tipo antidepressivo de flavonoides de *sweet violet* (*Viola odorata* L). Kumar et al (2019), por sua vez, evidenciou a eficácia do óleo essencial de *Isodon melissoides* (Benth.) H. Hara, em reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias no modelo de neuroinflamação induzida por LPS. Figueiró et al (2011) demonstraram os efeitos neuroprotetores do extrato de Marapuama (*Ptychopetalum olacoides* Benth). O estudo de Berkiks et al (2018) reporta que o extrato metanólico de *Thymelaea lythroides* apresenta o potencial de reprimir a resposta inflamatória e comportamento depressivo de longa duração associado neuroinflamação em ratos adultos após exposição neonatal ao LPS.

A relação das atividades biológicas de plantas medicinais no mundo evidenciada nesses estudos, reforça a relevância que o Brasil, em especial a região amazônica possui, visto que é dotada de uma grande diversidade vegetal, e representa uma vasta fonte para a pesquisa científica. A elucidação de possíveis aplicações farmacológicas dos extratos obtidos a partir de espécies vegetais inseridas na cultura medicinal amazônica, mostra-se um caminho promissor na busca por agentes efetivos e mais seguros.

## 1.5 VARRONIA MULTISPICATA:

### 1.5.1 Aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos

As plantas deste gênero inicialmente pertencentes à família das Boraginaceae, apresentavam Cordiaceae como uma subfamília de

Boraginaceae (JOHNSTON 1950; NOWICKE e MILLER, 1990; MILLER, 2007). Reúne cerca de 2.600 espécies, distribuídas em 130 gêneros. Todavia, evidências filogenéticas designaram Cordiaceae e outras subfamílias, ao nível de família (GOTTSCHLING et al, 2001, 2005; MILLER e GOTTSCHLING, 2007). A família Cordiaceae é considerada monofilética e cosmopolita (TARODA e GIBBS, 1986; MILLER e GOTTSCHLING, 2007), e abrange os gêneros *Coldenia* L., *Cordia* L. e *Varronia* P. Browne. Destes, somente as espécies de *Cordia* L. e *Varronia* P. Br. possuem ocorrência nativa no Brasil (CAVALHEIRO et al, 2003; MILLER e GOTTSCHLING, 2007).

*Varronia* P. Browne, que era classificado como um subgênero de *Cordia* L., foi recentemente redimensionado, com a promoção do *Varronia* P. Br. ao status de gênero. Apesar desta separação, *Cordia* continua sendo o maior em número de espécies de Cordiaceae, abrangendo cerca de 250 espécies com distribuição pantropical (MILLER, 2001; MILLER e GOTTSCHLING, 2007). As espécies deste gênero se concentram em regiões de clima tropical e subtropical, principalmente na América do Sul e Central, Índia, Ásia e África (MATIAS et al, 2010). No Brasil, se tem conhecimento de cerca de 45 espécies, predominantes em planícies sazonalmente secas de floresta tropical (TARODA e GIBBS, 1986; VIEIRA et al, 1994; MILLER, 2001).

Na medicina popular, algumas espécies do gênero *Cordia*, são utilizados na medicina tradicional mundialmente (IOSET et al, 2000; KUROYANAGI et al, 2001). A espécie *Varronia curassavica* Jacq., se destaca em *Cordia*, visto que apresenta destaque entre as outras espécies e interesse da indústria farmacêutica pelo fármaco Acheflan, utilizado como analgésico e anti-inflamatório por meio do óleo essencial extraído das folhas dessa espécie (SANTOS e PINHO, 2012).

Estudos fitoquímicos revelam uma grande variedade de metabólitos secundários presentes em *Cordia*, incluindo triterpenos, flavonoides, sesquiterpenos (MENEZES et al. 2004), saponinas (SANTOS et al, 2003), hidroquinonas (MANNERS, 1983) e quinonas (MENEZES et al, 2005). A *Varronia multispicata*, também conhecida popularmente por “carucaá, maria-preta, chá-de-caboclo e cavarucaá”, é uma espécie principalmente distribuída

em áreas abertas na região amazônica (VIEIRA et al, 1994; KUROYANAGI et al, 2003; FEUILLET, 2016), nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia, e em outras regiões do país: nordeste (Alagoas, Bahia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco), centro-oeste (Goiás), e sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) (MATIAS et al, 2010; MELO, 2013).

Esta planta é de porte arbustivo, de frutos pequenos e avermelhados. Sua inflorescência é vasta e séssil, com incapacidade de autofecundação, o que compõe um dos critérios de classificação para este gênero (MELO et al. 2013; VIEIRA, 1997). Na medicina popular, a *V. multispicata* apresenta alegação de uso como expectorante e no tratamento de contusões, apesar de não existirem estudos que validem estas indicações (KUROYANAGI et al, 2001). Em um dos poucos estudos já realizados, Da Silva et al (2010), avaliaram o potencial antioxidante do extrato acetônico das folhas em relação ao seu conteúdo fenólico total. O extrato apresentou atividade antioxidante, porém menos expressiva que padrão utilizado.

Ainda, outros grupos de pesquisas têm identificado a presença triterpenóides como ursano, oleanano e dammarano (Cordianol A), a partir da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas. À estas substâncias foram atribuídas potencial atividade anti-androgênica (KUROYANAGI et al, 2001, 2003). Das Graças et al (2011), apontou o  $\beta$ -cariofileno como o sesquiterpeno volátil predominante no óleo das folhas, inflorescência, hastes e partes aéreas de *V. multispicata*.

Portanto, o estudo de drogas, extratos vegetais que possam recuperar o estado depressivo através de um processo neuroinflamatório, se torna essencial para investigação de novas alternativas terapêuticas que possam reverter quadros de doenças e transtornos que acometem o SNC. Para auxílio desses estudos, modelos de indução de neuroinflamação por LPS foram consolidados e permitem aproximação de estudos experimentais com estudos clínicos.

Nesse contexto, o presente trabalho visa investigar o potencial terapêutico do Extrato Aquoso de *Varronia multispicata*, típica de regiões de clima tropical e subtropical, principalmente na América do Sul e Central, Índia, Ásia e África. (VIEIRA et al, 1994; MILLER, 2001). A espécie selecionada está inserida na

cultura medicinal amazônica, sendo popularmente usada como anti-inflamatório, antimicrobiano, antifúngico, analgésico, tratamento do sistema digestivo, respiratório, cardíaco, distúrbios vasculares e sanguíneos (MATIAS et al, 2015).

No entanto, não se tem estudos científicos até hoje, que mostrem a atividade de *Varronia multispicata* sobre o comportamento do tipo depressivo em modelo de neuroinflamação. De forma a direcionar a investigação para a hipótese neuroinflamatória da depressão, estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa já têm revelado que esta espécie apresenta atividade anti-inflamatória periférica e antinociceptiva (LOPES, 2019).

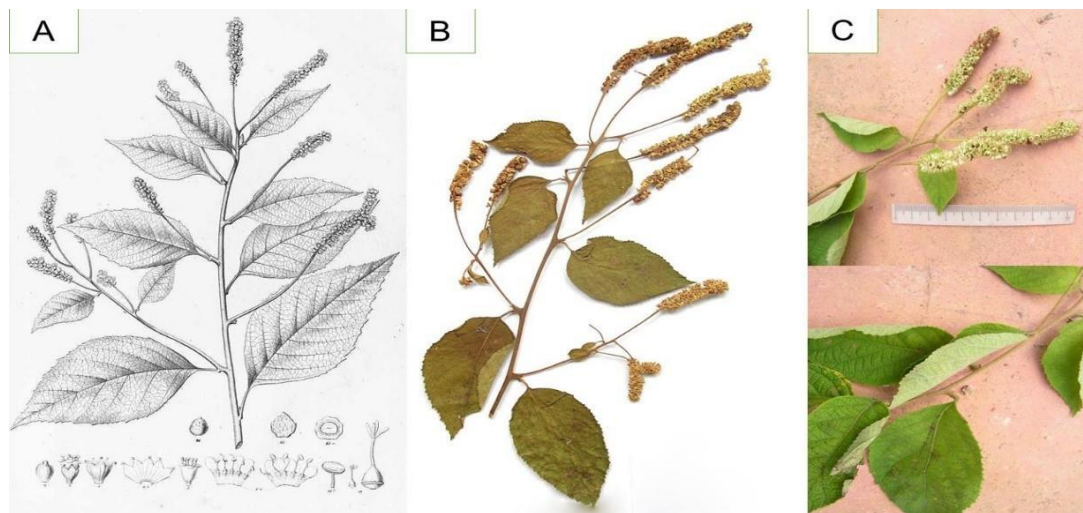


Figura 4 - *arronia multispicata*. A: ilustração da espécie. Fonte: Martius et al. (1987). B e C: Florescência e folhas. Fonte: Herbário UFP (2010).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Avaliar os efeitos do extrato aquoso liofilizado de *Varronia multispicata* (VAR01) sobre o comportamento do tipo depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Avalia os efeitos do VAR01 sobre o comportamento dos animais em campo aberto;
- Verificar seus efeitos sobre o comportamento de autocuidado;
- Avaliar a influência da droga sobre o comportamento de autopreservação.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal foi legalmente coletado *in locus* no município de Castanhal PA em uma área localizada a 01°18'25.63" de latitude e 47°45'18.01" de longitude, sob o consentimento do proprietário. As Coordenadas geográficas foram obtidas por um aparelho de GPS (Global Positioning System). A identificação botânica do material foi realizada pela parobotânica Silvana Rodrigues Tavares do Herbário da EMBRAPA-PA, no qual a exsicata se encontra depositada sob o registro IAN-188979.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O preparo do extrato aquoso liofilizado das folhas de *V. multispicata* foi realizado pelo Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL/UFGA). As folhas da planta foram cuidadosamente selecionadas, lavadas em água corrente e postas à secagem em estufa com fluxo de ar forçado (45 °C) durante 72 horas.



Figura 5 - fluxograma da obtenção do Extrato Aquoso de Varronia multispicata (VAR01). Fonte: autor.

O material seco resultante foi pulverizado em um moinho de facas obtendo-se 200 g de pulverizado, sequencialmente submetido a infusão em 2 L

de água destilada à 100 °C por 30 minutos. A solução resultante foi filtrada, e posteriormente liofilizada (1 mba/-20 °C), obtendo-se 18 g de VAR01, correspondendo a um rendimento de 9%, como mostrado na figura 7.

### 3.4 DROGAS

Nos procedimentos de avaliação da atividade biológica foram adotados o Lipopolissacarídeo (LPS; 3mg/kg; Sigma-Aldrich) de *E.coli* (055:B5) como agente flogístico para indução do comportamento do tipo depressivo associado a neuroinflamação; o Cloridrato de Fluoxetina (FLX; 20 mg/kg; Daforin®; EMS Sigma Pharma LTDA), inibidor seletivo da recaptação de serotonina, como droga padrão; a Cetamina antagonista não competitivo dos receptores NMDA, e Xilazina, anestésico agonista alfa-2 adrenérgico, para indução de anestesia.

A adoção do FLX como droga padrão se deve a sua capacidade de inibir significativamente a ativação microglial induzida pelo LPS, bem como a subsequente liberação de múltiplos fatores pró-inflamatórios (Zhang et al, 2012).

O Extrato Aquoso Liofilizado de *Varronia mustispicata* (VAR01) foi solubilizado em salina 0,9%, sendo adotada a dose de 150 mg/kg, dose efetiva mediana identificada em estudo prévio de nosso grupo (LOPES, 2019) e sua solução oral foi administrada diretamente no animal na concentração de 15mg/mL.

A via oral (v.o.) foi eleita para o tratamento com FLX e VAR01. Para o LPS e anestesia (Cetamina+Xilazina) foi adotada a via intraperitoneal (i.p.). Todas as soluções foram administradas em volumes de 0,1 ml para cada 100 g da massa corpórea do animal.

### 3.5 ANIMAIS

O projeto foi aprovado pela comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFPA sob o parecer CEUA nº 2986170418 (ID 000858), seguindo aos critérios de Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais. Os procedimentos experimentais comportamentais e bioquímicos foram realizados no Laboratório

de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO) da Faculdade de Farmácia da UFPA e em laboratórios parceiros.

Foram utilizados 32 machos da espécie *Rattus norvegicus* (wistar), adultos jovens, com massa corporal entre 150 e 170 g, provenientes do Biotério Central da UFPA.

Os animais foram alocados no Biotério da Faculdade de Farmácia da UFPA e mantidos em gaiolas plásticas (39x32x16 cm), com 4 ratos por gaiola, com forração de maravalha, sob condições padronizadas de temperatura ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), exaustão, ciclo de luz claro escuro de 12h (claro iniciado às 06h). A alimentação e água foram disponibilizadas *ad libitum*.

### 3.6 MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO

Os ratos foram randomicamente dispostos em 4 grupos (n=8 animais/grupo), conforme apresentado na tabela 1 e figura 6.

Grupo	N	Tratamento Oral	Administração Intraperitoneal
BRANCO	8	Salina 0,9%	Salina 0,9%
LPS	8	Salina 0,9%	Lipopolissacarídeo 3 mg/kg
VAR01	8	VAR01 150 mg/kg	Lipopolissacarídeo 3 mg/kg
FLX	8	Fluoxetina 20 mg/kg	Lipopolissacarídeo 3 mg/kg

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais.

BRC – Branco;

LPS – Lipopolissacarídeo, Controle negativo;

VAR01 – *Varronia multispicata*;

FLX – Fluoxetina, grupo padrão de tratamento.

O tratamento oral foi feito com cânula orogástrica, de acordo com o grupo, por 6 dias consecutivos (D1 – D6), em intervalos de 24 horas (adaptado de Zhang et al, 2012; Kazak, 2017). Trinta minutos após a última administração oral, procedeu-se a administração i.p. de salina 0,9% (BRANCO) ou LPS 3,0 mg/kg (LPS, VAR01 e FLX) ( Zhu et al, 2015; Yao et al, 2015).

Passadas 24 horas da administração i.p., deu-se início a avaliação dos possíveis efeitos do VAR01 sobre o comportamento, a saber:

- **Avaliação comportamental** – incluindo os testes do campo aberto, *splash test* e nado forçado, dada a importante relação recíproca entre o SNC e o sistema imunológico, evidenciando alterações comportamentais e neurológicas como Alzheimer e Depressão validadas por esses testes (ZHU *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2013).

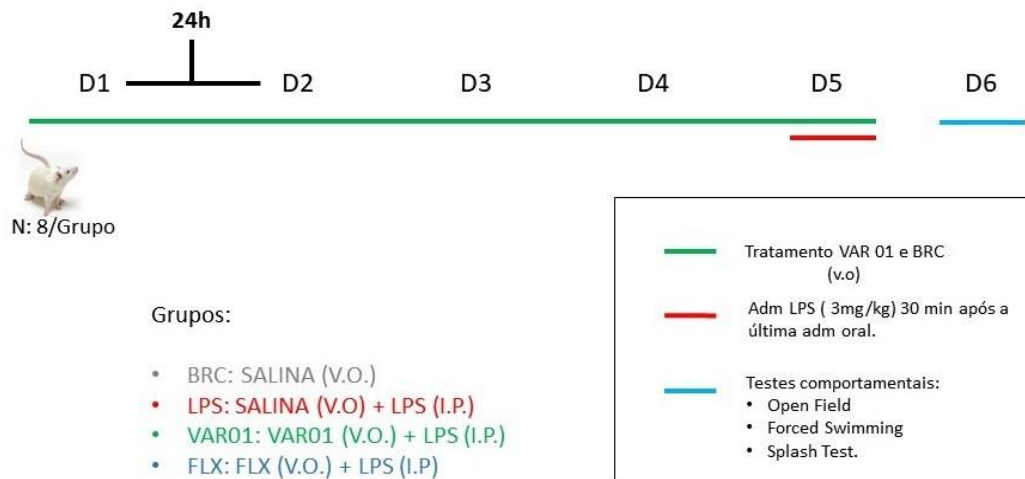


Figura 6 - desenho experimental do modelo de comportamento do tipo depressivo induzido por LPS estudado. Fonte: autor.

### 3.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os testes comportamentais foram iniciados 24 h após a administração de LPS, sendo realizados entre 11 e 15 h em uma sala de luminosidade baixa, havendo habituação prévia de pelo menos 1 h.

#### 3.3.1 Teste do campo aberto (*open field*)

Originalmente descrito por Hall (1934), se baseia no princípio de que os roedores naturalmente têm aversão a ambientes novos e abertos, e utiliza a atividade exploratória para inferir o grau de emocionalidade do animal em um ambiente novo. Por meio dessa premissa, baseado no movimento do animal, é possível quantificar o comportamento do tipo ansioso através da atividade

locomotora espontânea geral na arena. O aparato experimental trata-se de uma arena quadrada de madeira de cor preta (LxPxA – 100cm x100 cm x40 cm) com o topo aberto.

Parâmetros como a distância total percorrida (quadrantes centrais e periféricos); tempo de permanência no centro do aparato (tempo em que o animal permanece nos quadrantes centrais da caixa); locomoção no centro (distância percorrida pelo animal nos quadrantes centrais); *Rearing* (número de vezes que o rato se levanta sobre as patas traseiras, ficando perpendicular à arena); *Freezing* (quando o animal permanece “congelado” ou imóvel sobre as quatro patas e sua parte ventral não está encostada na superfície da caixa) e *Grooming* (tempo em segundos gasto com autolimpeza), foram contabilizados após o animal ser colocado no quadrante central do aparato, e observados durante 05 minutos.

Antes de cada animal ser colocado no aparato, a arena foi limpa com álcool a 70% para eliminar possíveis pistas e odores deixado pelo animal anterior. No intervalo de cada animal na arena, foram permitidos 2 minutos para que houvesse secagem completa por ventilação para que se iniciasse o próximo animal. A atividade do rato foi monitorada por vídeo através de uma câmera posicionada acima da arena para ser analisados off-line com o software ANY-maze™ (Stoelting, EUA) por observação duplo-cego.

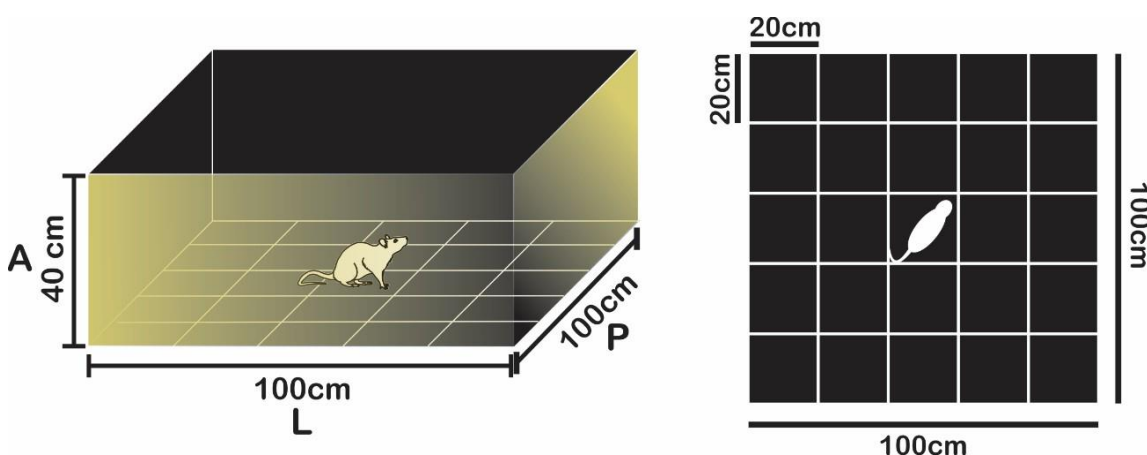


Figura 7 - Arena do campo aberto. fonte: autor

### 3.3.2 Teste de borrifagem de sacarose (*splash test*)

Este teste avalia o comportamento anedônico, o autocuidado e o comportamento motivacional dos animais. Consiste em uma borrifada (pulverização) de solução de sacarose 10% (0,35 mL por rato) na região dorsal do animal. Após o esguicho, o animal é colocado em uma câmara de observação (LxPxA – 60cm x 40 cm x 30 cm), sendo observados os movimentos de grooming (autolimpeza) realizados pelo animal (figura 10) durante cinco minutos (SURGET e BELZUNG, 2008; ISINGRINI et al, 2010; DUCOTTET et al, 2003). A redução do comportamento motivacional e do autocuidado, caracterizado pelo aumento da latência para o início e diminuição do tempo gasto com o autocuidado, são considerados marcadores de comportamento do tipo depressivo (D'AUDIFFRET et al, 2010).

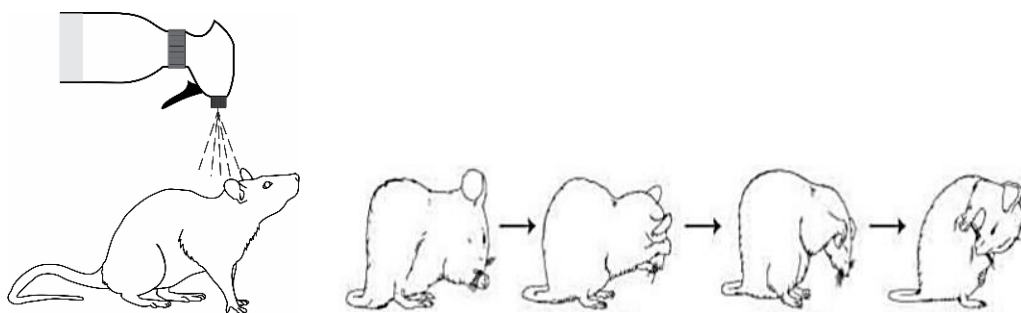


Figura 8 - Movimentos de autolimpeza (*grooming*) iniciado a partir da pulverização de sacarose 10% no dorso de ratos. Na sequência, observam-se movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do nariz; movimentos unilaterais envolvendo uma pata, que alcançam até as vibrissas; movimentos amplos bilaterais feitos simultaneamente; e movimentos prolongados de autolimpeza do corpo. Fonte: Adaptado de Berridge et al (2015)

### 3.3.3 Teste do nado forçado (*forced swimming test*)

O teste descrito por Porsolt et al (1997) é fundamentado no comportamento de autopreservação dos ratos, que em situações de desespero, como o nado, tornam-se imóveis após intenso esforço físico, realizando apenas movimentos necessários para não afundar. Este tempo de imobilidade é, portanto, considerado como marcador de comportamento do tipo depressivo, sendo este teste considerado padrão ouro para avaliação de drogas antidepressivas, que caracteristicamente reduzem este comportamento.

O teste consiste em colocar os animais individualmente em um cilindro acrílico (25 cm de altura e 10 cm de diâmetro) contendo água a uma temperatura entre 22 a 24°C. Os animais foram habituados no aparato por dois minutos e a seguir avaliados quanto ao tempo de imobilidade (é o tempo em segundos em que o animal tem ausência de comportamentos ativos como natação, saltos, hearing ou mergulho), tempo de *Hearing* e quantidade de mergulhos, por um período de 5 minutos (Figura 9).

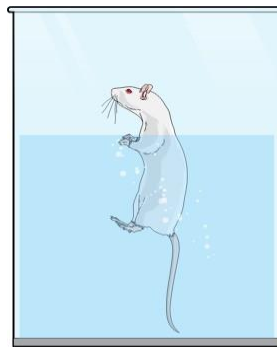


Figura 9 - teste do nado forçado. Fonte: mind the graph (2019).

### 3.4 EUTANÁSIA

Após a avaliação comportamental os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a análise estatística será utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste post hoc Holm-Sidak. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

#### 4.1.1 Efeito do VAR01 sobre a atividade locomotora total no teste do Campo Aberto

Quando submetidos ao campo aberto, teste realizado após 24 horas a administração com LPS, observou-se que o LPS reduziu a deambulação dos animais de forma significativa quando comparado ao grupo BRANCO. No entanto, o tratamento com o VAR01 (150 mg/kg) reverteu significativamente (\*\* $p < 0,001$ ) o efeito do LPS, aumentando a atividade locomotora no campo aberto de forma equivalente ao grupo FLX (figura 10).

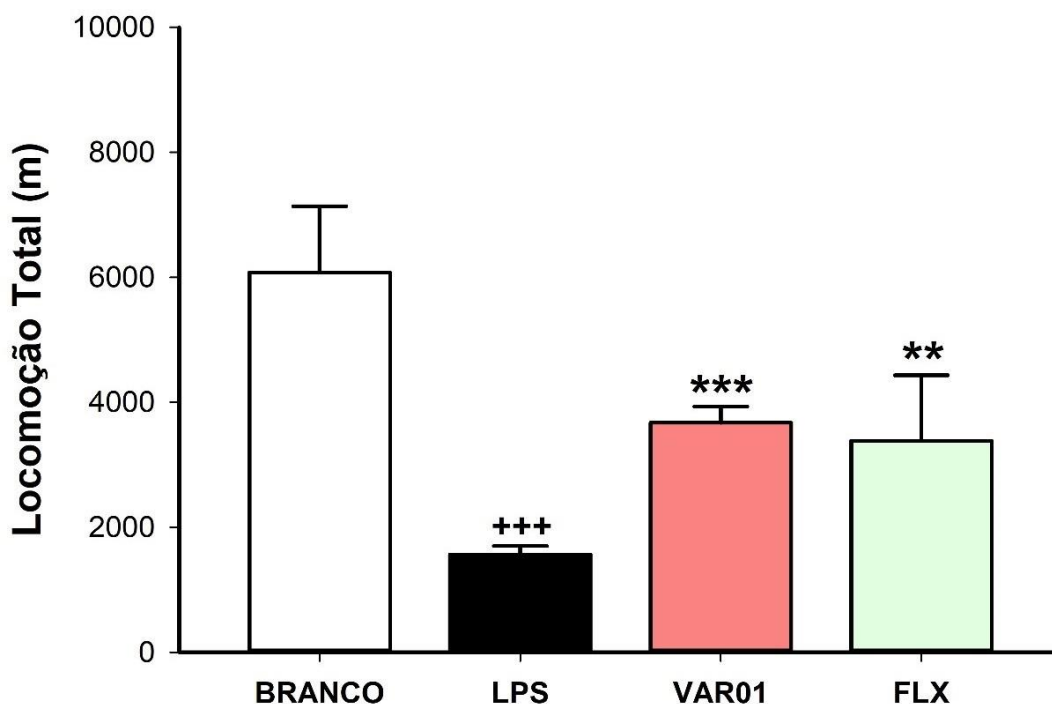


Figura 10 – Efeito do VAR01 sobre a atividade locomotora espontânea de ratos no campo aberto, no contexto do comportamento do tipo depressivo induzido por LPS. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (n=8 animais/grupo) da distância total percorrida durante 300 s em metros. ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Onde \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .



#### 4.1.2 Efeito de VAR01 sobre o tempo de *Freezing* no teste do Open Field

A administração i.p. de LPS (3 mg/kg) promoveu um aumento significativo sobre o tempo de *freezing*, quando comparado ao grupo BRANCO. O pré-tratamento com VAR01 (150 mg/kg), no entanto, preveniu os efeitos induzidos pelo LPS, levando o padrão de *freezing* a níveis equivalentes ao grupo BRANCO e ao padrão FLX (figura 12).

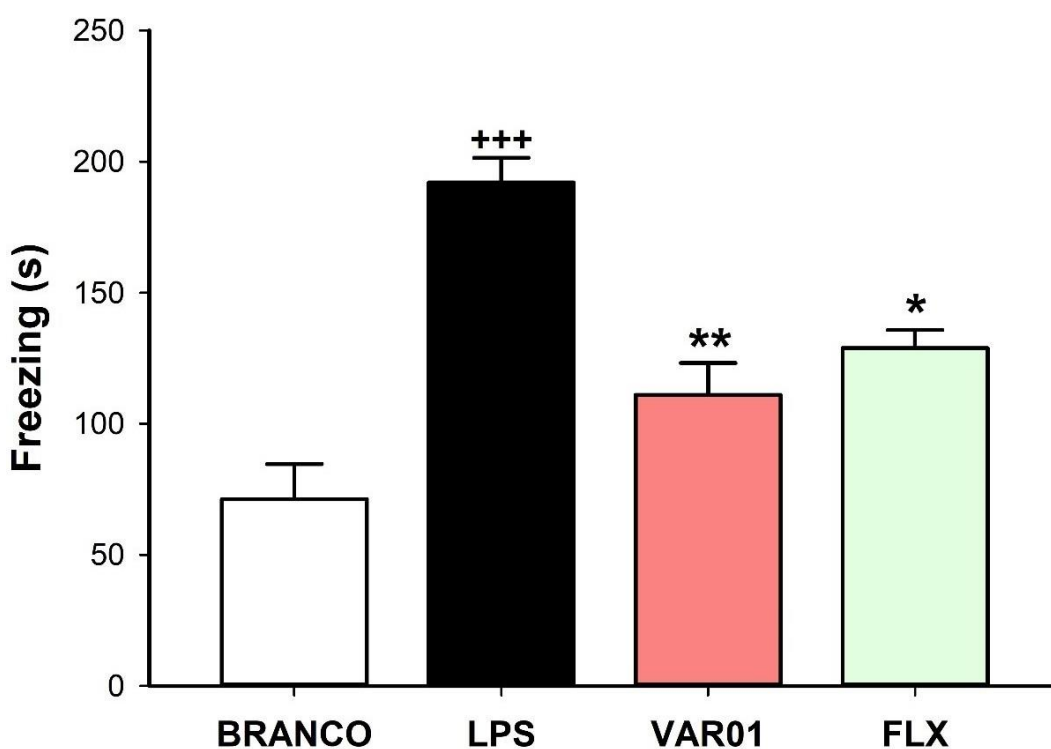


Figura 11 - Efeito do VAR01 sobre a atividade no tempo de *freezing* em ratos no contexto do comportamento do tipo depressivo induzido por LPS no campo aberto. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM (n=8 animais/grupo) do comportamento apresentado durante 300 s. \*p <0,05 versus grupo LPS. ANOVA de uma via seguido do post hoc de Holme-Sidak.

#### 4.1.3 Efeito do VAR01 sobre o comportamento de autolimpeza (*grooming*)

- *Splash test*.

A borrifagem de solução de sacarose 10% no dorso dos animais estimula o comportamento de autolimpeza. Observou-se que a administração do LPS (3 mg/kg; i.p.) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) esse comportamento em comparação com o grupo BRANCO. O efeito do LPS foi revertido pelo tratamento com FLX (20 mg/kg). O tratamento oral com VAR01 (150 mg/kg), no entanto, não exerceu influência sobre os efeitos do LPS (figura 15).

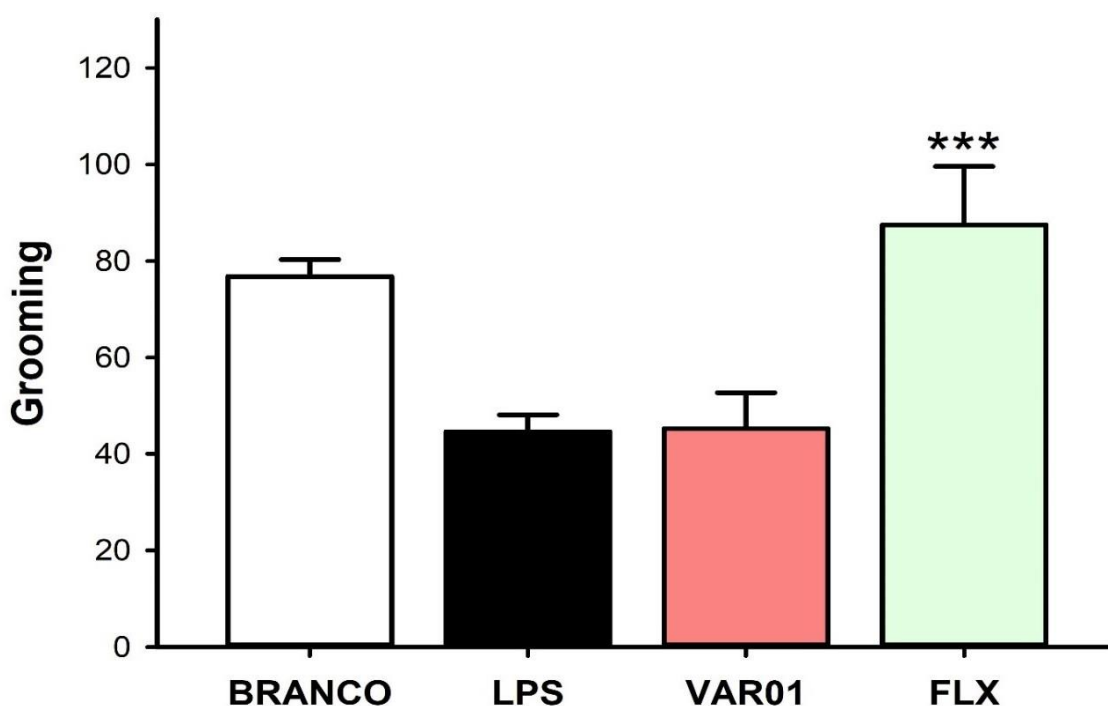


Figura 12 – Efeitos do VAR01 sobre o comportamento de autolimpeza no contexto do comportamento do tipo depressivo induzido por LPS em ratos no splash test. Dados expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=8$ /grupo) do tempo de grooming apresentado no intervalo 5 minutos. \*\*\* $p < 0,001$  versus grupo LPS. ANOVA de uma via seguido do post hoc de Holme-Sidak.

#### 4.1.4 Efeito do VAR01 sobre o tempo de imobilidade no nado forçado

A administração i.p. de LPS (3 mg/kg) promoveu um aumento ( $p < 0,01$ ) do tempo de imobilidade no teste do nado forçado. O tratamento oral com

VAR01, no entanto, mostrou-se eficaz em prevenir tal efeito, promovendo comportamento equivalente ao grupo BRANCO nos animais. Observou-se ainda que o efeito promovido pelo VAR01 se mostrou equivalente ao padrão FLX (20 mg/mL) (figura 14).

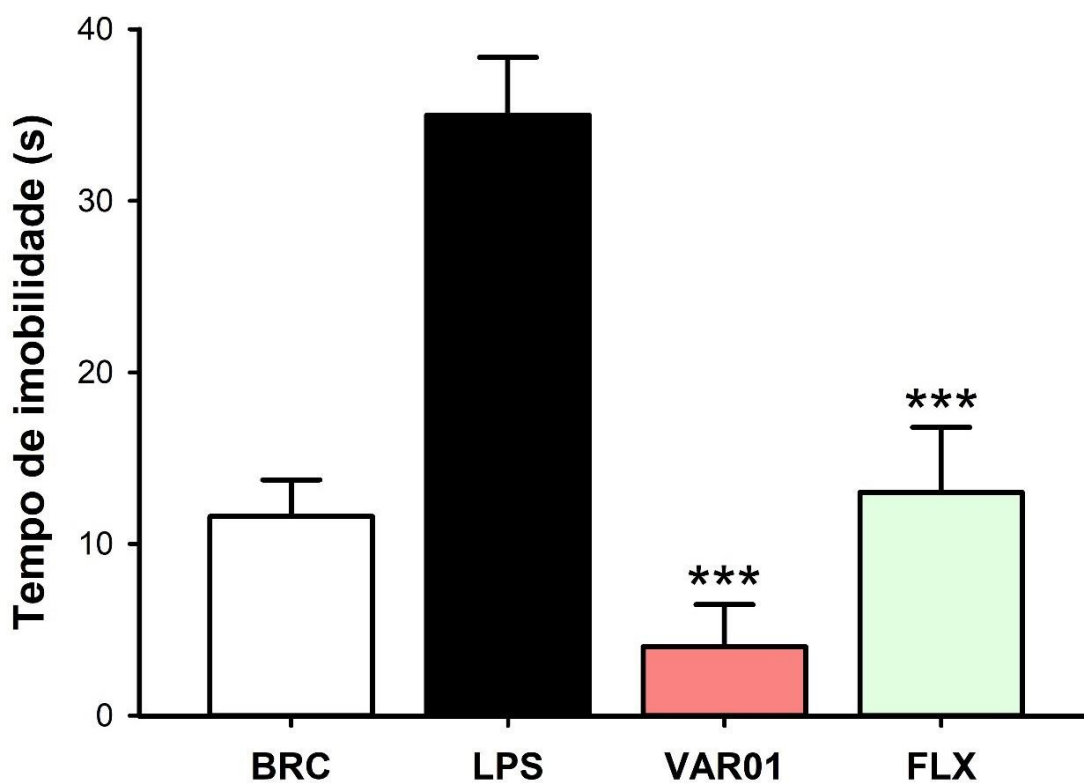


Figura 13 – Efeito do VAR01 sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em animais tratados com VAR01 comparado ao grupo controle LPS no modelo de depressão induzida por LPS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=8/ grupo) do número de groomings. Calculados por ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey, onde \*\*\*p<0,001

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo fundamentou-se na hipótese de que o VAR01 seria capaz de inibir o comportamento do tipo depressivo em ratos submetidos a administração de LPS (3 mg/kg). Apresenta, portanto, evidências científicas inéditas acerca da atividade da espécie vegetal amazônica *Varronia multispicata* sobre a locomoção, comportamento emocional de autocuidado e autopreservação em modelos murinos. Nesse contexto, demonstra a capacidade de seu extrato aquoso liofilizado de inibir o comportamento do tipo depressivo induzido pela administração intraperitoneal de LPS, sem comprometer a atividade locomotora dos animais.

A literatura científica tem demonstrado os efeitos comportamentais induzidos pela administração sistêmica de LPS para esclarecer sua relação com o comportamento do tipo depressivo ( DUNN e SWIERGIEL, 2005; JIANG et al, 2017; SABREDRA-SOUSA et al, 2018; LEE et al, 2018). Notoriamente, as alterações comportamentais induzidas por esta endotoxina estão relacionadas com o tempo e, mais precisamente, o período de tempo de 24 h após a administração de LPS(OHGI et al, 2013; ZHU et al, 2015; YAO et al, 2015). Por essa razão, adotamos esse recorte de tempo para nosso estudo, a fim de avaliar o comportamento do tipo depressivo em ratos.

A seleção da droga experimental e da dose originou-se de estudos anteriores realizados por nosso grupo, que demonstraram a baixa toxicidade do VAR01, bem como suas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória, para as quais apresentou dose efetiva mediana de 146,89 mg/kg (LOPES et al., 2019), adotamos, por aproximação, a dose de 150 mg/kg como padrão para início dos testes. A propriedade anti-inflamatória significativa do extrato, frente ao contexto neuroinflamatório da depressão, despertou a questão sobre sua possível influência em processos inflamatórios encefálicos e, conseqüentemente, seu aproveitamento para o tratamento de doenças neuroinflamatórias, como a depressão.

Entre as manifestações clínicas apresentadas por pacientes depressivos, assim como em reações adversas promovidas pelo uso de medicamentos

antidepressivos estão as alterações do sono, coordenação motora e nível de energia (MORENO,1999; MORAES et al., 2010). Por essa razão, a avaliação comportamental foi iniciada abordando os efeitos do LPS sobre o comportamento exploratório dos animais e a influência do tratamento com VAR01 (150 mg/kg) sobre esse contexto. Essa análise é ainda fundamental para evitar interpretações equivocadas e/ou resultados falso positivo, caso a droga experimental possua a capacidade de alterar significativamente atividade locomotora dos animais.

O LPS, quando administrado sistemicamente, desencadeia, além da diminuição da exploração do ambiente, sinais de desespero e comportamento anedônico (BERG et al., 2004). No teste do campo aberto, o grupo de animais que recebeu LPS (3mg/kg; i.p.) apresentou redução significativa da deambulação, reafirmando o padrão de comportamento promovido pelo LPS (KIRSTEN, 2015). A literatura científica demonstra que essa mudança no comportamento promovida pelo LPS, implica em eventos relacionados a expressão do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). A redução do BDNF em estruturas límbicas com perfil atrofiado e o aumento de citocinas pró-inflamatórias por células da glia em estruturas límbicas, incluindo o hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala, levam não só a anedonia, mas a sintomas depressivos como perda de prazer, desinteresse, medo, além de desencadear um processo neuroinflamatório com intensa liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL- 1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; CASTRÉN et al, 2007; VISMARI, 2008; DANTZER et al., 2001).

Nesse contexto, o pré-tratamento com VAR01 (150 mg/kg) reduziu significativamente o prejuízo gerado pelo LPS, favorecendo uma deambulação semelhante ao grupo BRANCO, que não foi submetido ao agente flogístico. Note-se ainda que o efeito promovido pelo extrato acompanhou o padrão de atividade da FLX, droga padrão para o tratamento da depressão. Estudos realizados por nosso grupo já haviam demonstrado que o VAR01, quando administrado isoladamente, não promove alterações na atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto, tanto na faixa de dose explorada no presente estudo quanto em doses elevadas (2.000 mg/kg) (LOPES et al., 2019). Demonstraram, portanto, que o extrato, mesmo em dose mais de dez vezes

maior que a utilizada no presente estudo, não interfere no comportamento exploratório dos animais, sua consciência ou em sua capacidade de execução de movimentos. Para além disso, o presente estudo vem demonstrar de forma inédita, que o extrato não só não compromete o comportamento natural dos animais como é capaz de reduzir o prejuízo locomotor induzido pelo LPS.

Outro parâmetro comportamental comprometido pelo LPS é o *freezing*, que corresponde à conduta de imobilidade do animal sobre as quatro patas, sendo que a parte ventral não está encostada na superfície da caixa. Em nossos experimentos, a administração do LPS (3 mg/kg; i.p.) elevou significativamente o tempo de *freezing* dos animais, quando comparado ao grupo BRANCO. Tal efeito pode estar relacionado a dose de LPS adotada, 3 mg/kg, visto que essa dose é capaz de promover neuroinflamação, com indução da expressão citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (KAZAK e YARIM, 2017). A região da amígdala, por exemplo, está envolvida com respostas emocionais, em especial as emoções desagradáveis, como o reflexo do medo, sintoma característico da depressão. Sabe-se que a resposta do congelamento é a reação de defesa mais comum quando os ratos são expostos em situações perigosas e está intimamente ligado a região do núcleo lateral da amígdala que está alterada quando o animal se depara com estímulos aversivos (ROZENTHAL et al., 2004 LANDEIRA-FERNANDEZ et al., 2006).

Seguindo o contexto neuroinflamatório, alterações na amígdala, podem estar diretamente ligadas a atividade do eixo HPA, sistema envolvido na fisiopatologia da depressão, já que o estresse ativa esse eixo e dispara o sistema límbico. Portanto, o aumento no tempo de congelamento do grupo LPS como consequência de uma possível resposta neuroinflamatória, pode estar relacionado com a desregulação da amígdala, ativação de células microgliais além da ativação do sistema HPA.

O tratamento dos animais com VAR01 (150 mg/kg) reduziu significativamente as alterações promovidas pelo LPS, trazendo o tempo de *freezing* ao nível do grupo BRANCO. Importante destacar também que o grupo VER01 apresentou comportamento equivalente ao padrão FLX.

Ainda em relação aos componentes de emocionalidade avaliados no teste do campo aberto. A deambulação na área central da arena é um comportamento evitado por ratos, quando submetidos a um ambiente novo, preferindo permanecer na periferia do aparato, comportamento conhecido como tigmotaxia (CAMPOS et al., 2013; HABR et al., 2011). No experimento realizado, observou-se uma tendência de redução da deambulação dos animais do grupo LPS na área central, em comparação com o grupo BRANCO (dados não apresentados), indicando um estado do tipo ansioso. O VAR01, em contrapartida, demonstrou a tendência de normalização da tigmotaxia (dados não apresentados), ratificando os potenciais benefícios observados sobre o tempo de *freezing*.

Diante de tais evidências, a avaliação voltou-se a testes mais específicos para avaliação do comportamento do tipo depressivo. No teste de borrifagem de sacarose (10%), mais conhecido como *splash test*, é explorado o comportamento de autolimpeza e autocuidado dos animais frente a percepção do líquido viscoso sobre o pelo. Nessa condição, os animais desenvolvem os movimentos de *grooming*. Esse comportamento está propriamente relacionado a respostas motivacionais, sendo a sua redução, considerada como evidência de anedonia (CASTRÉN et al, 2007).

O comportamento anedônico, está relacionado a atividade hipocampal, além de envolver alterações em regiões mesolímbicas e mesoestriatais que são influenciadas por variantes genéticas e agentes de agressão, como o LPS (STEIN, 2008; GARCIA et al., 2009; CASARIL, 2019). Neste contexto, como esperado, observou-se que a administração de LPS (3 mg/kg i.p.) reduziu significativamente o tempo de grooming, induzindo comportamento anedônico nos animais.

Diante deste contexto que tipifica manifestações clínicas da depressão, observou-se que o tratamento prévio com VAR01 (150 mg/kg) não foi capaz de alterar o prejuízo induzido pelo LPS, sugerindo que o extrato não promove influência sobre o comportamento anedônico (LIEBERKNECHT, 2017). O tratamento antidepressivo FLX, por outro lado, é capaz de reverter eficientemente o comportamento induzido pelo LPS, o que corrobora com os estudos de Schulz et al (2007) que demonstraram a elevação do *grooming* diante

do tratamento com o ISRS (FLX). A elevação do tempo de *grooming* também tem sido relacionada a atividade agonista gabaérgica, fato observado por Osborne (1993), evidenciando que o sistema gabaérgico pode estar envolvido na resposta anedônica.

Aplicou-se ainda o teste do nado forçado, considerado o padrão ouro para avaliação de drogas com potencial antidepressivo. A literatura aponta que o tratamento sistêmico com LPS produz alterações marcantes no comportamento diante do contexto aversivo do teste do nado forçado (JIANG, et al., 2017; FAKHRAEI et al., 2018; ZHANG et al., 2018). ZHANG et al (2018) demonstraram em seu estudo que, 24 horas após a administração aguda ou crônica de LPS há evidente alteração comportamental, manifestando respostas do tipo depressiva. Isso foi observado pelo aumento significativo do tempo de imobilidade dos ratos submetidos a esse teste. Desta forma, o teste do nado forçado é fundamentado na premissa de que o comportamento do tipo depressivo é capaz de ser expresso por meio do aumento no tempo de imobilidade em situações de desespero como a natação forçada (FAKHRAEI et al., 2018). Portanto, LPS 3mg/kg ao aumentar o tempo de imobilidade no nado forçado, confirma a validação do modelo de depressão proposto.

Embora nenhum modelo animal seja capaz de abranger todas as características referente aos sintomas depressivos que acometem os humanos, o tempo de imobilidade através do nado forçado é até os dias de hoje, uma ferramenta confiável na triagem das propriedades antidepressivas de drogas (FAKHRAEI et al., 2018).

No presente estudo, a administração do LPS (3 mg/kg) promoveu elevação expressiva do tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado, tendo sido avaliado 24 horas após a administração deste agente flogístico. Esse resultado reafirma o comprometimento dos reflexos de autopreservação do animal, indicando um comportamento do tipo depressivo subsequente ao processo neuroinflamatório induzido pelo LPS (BERG, 2003; WANG, et al., 2019). Os animais pré-tratados com VAR01 (150 mg/kg), em contrapartida, apresentaram comportamento semelhante ao grupo BRANCO, promovendo potente inibição dos prejuízos gerados pela administração do LPS.



Diante disso, o efeito promovido pelo tratamento prévio com VAR01 (150 mg/kg) evidencia possível atividade do tipo antidepressiva.

Lopes et al. (2019), como citado anteriormente, demonstrou a propriedade anti-inflamatória do VAR01, que foi capaz de inibir a formação de edema associado a produção de eicosanoides e citocinas. Mostrou-se também capaz de inibir a migração leucocitária e a produção de óxido nítrico no modelo de peritonite induzida por carragenina. O autor sugere ainda a modulação de mediadores eicosanoides entre os possíveis mecanismos de ação do extrato. Considerando que o comportamento do tipo hiperansioso relacionado a administração de LPS envolve a indução inflamatória no sistema nervoso central, o conjunto destes achados corroboram com a hipótese de que o benefício gerado pelo VAR01 sobre os prejuízos comportamentais induzidos pela administração de LPS estejam relacionados a sua capacidade de modular processos neuroinflamatórios. Tais indicações são ainda reforçadas por suas propriedades anti-inflamatórias, o que deve melhor investigado em pesquisas futuras, incluído o estudo de seus efeitos sobre os marcadores de resposta celular (ativação microglial) e humoral (expressão de citocinas pró-inflamatórias) da inflamação central, bem como a influência sobre fatores neurotróficos e hormonais.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo demonstra pela primeira vez que o VAR01 foi capaz de inibir o desenvolvimento de comportamento do tipo-depressivo em ratos submetidos a neuroinflamação induzida pela administração sistêmica de LPS. Reafirma ainda, que o extrato não promove prejuízos sobre a atividade locomotora e exploratória dos animais, garantindo assim, sua reprodutibilidade em novos estudos. Estes dados evidenciam, que VAR01 apresenta potencial como fármaco inovador, sendo necessário, no entanto, o prosseguimento do estudo para melhor caracterização destas propriedades, bem como para elucidação dos mecanismos subjacentes e circuitos neurais envolvidos na depressão.

## 7 REFERÊNCIAS

ALBERT, Paul R; BENKELFAT, Chawki; DESCARRIES, Laurent. The neurobiology of depression — revisiting the serotonin hypothesis . I . **Cellular and molecular mechanisms**. p. 2378–2381, 2012.

AUDIFFRET, Alexandre C; FRISBEE, Stephanie J; STAPLETON, Phoebe A; *et al.* Depressive behavior and vascular dysfunction : a link between clinical depression and vascular disease ? **J Appl Physiol**, p. 1041–1051, 2010.

BERG, Brian M.; GODBOUT, Jonathan P.; KELLEY, Keith W.; *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 18, n. 2, p. 149–157, 2004.

BERMAN, Robert M; CAPPIELLO, Angela; ANAND, Amit; *et al.* Antidepressant Effects of Ketamine in Depressed Patients. **Psychopharm Review**. 3223, n. 99, 2000.

BOKU, Shuken; NAKAGAWA, Shin; TODA, Hiroyuki; *et al.* Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. **Psychiatry and Clinical Neurosciences** p. 3–12, 2017.

BOOIJ, Linda; DOES, A J Willem Van Der; HAFFMANS, P M Judith; *et al.* Acute tryptophan depletion in depressed patients treated with a selective serotonin – noradrenalin reuptake inhibitor: Augmentation of antidepressant response ? **J. affective disorders** v. 86, p. 305–311, 2005.

BOOIJ; COWEN, Philip J; FAVA, Maurizio; *et al.* Predictors of Mood Response to Acute Tryptophan Depletion: A Reanalysis. **Neuropsychopharmacology**. n. 02, 2002.

CAMPOS, A. C. *et al.* Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria**. São Paulo. v. 35 Suppl 2, p. S101–11, 2013.

CARLESSI, Anelise S.; BORBA, Laura A.; ZUGNO, Alexandra I.; *et al.* Gut microbiota–brain axis in depression: The role of neuroinflammation. **European Journal of Neuroscience**, n. August, p. 1–14, 2019.

CAVALHEIRO, Larissa; FERNANDES, Denilson; PERALTA, I; *et al.* Flórua fanerogamica da planicie litoranea de Picinguaba , Ubatuba , SP , Brasil : Boraginaceae. **Hoehnea**, v. 30, n. 3, 2003.

DA SILVA, Thiago B.; SOUZA, Vivian Karoline T.; DA SILVA, Ana Paula F.; *et al.* Determination of the phenolic content and antioxidant potential of crude extracts and isolated compounds from leaves of *Cordia multispicata* and *Tournefortia bicolor*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 1, p. 63–69, 2010.

DANTZER, Robert. Cytokine-Induced Sickness Behavior : **Annals new york academy of sciences**, n. 33, p. 222–234, 2001.

DAR, Refaz Ahmad; SHAHNAWAZ, Mohd; QAZI, Parvaiz Hassan; *et al.* General overview of medicinal plants: A review. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 6, n. 6, p. 349–351, 2017.

DAS GRACAS, M.; ZOGHBI, B.; ANDRADE, E. H.A.; *et al.* Volatiles of the cordia multispicata cham.: A weed medicinal brazilian plant. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 6, p. 543–545, 2010.

DEAN, Jason; KESHAVAN, Matcheri. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 27, p. 101–111, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>>.

DOMINGUES, Micaela; MARIA, Angela; ANDRADE, Darling De; *et al.* Depression- and anxiogenic-like behaviors induced by lipopolysaccharide in mice are reversed by a selenium-containing indolyl compound: Behavioral, neurochemical and computational insights involving the serotonergic system. **Journal of Psychiatric Research**, v. 115, n. May, p. 1–12, 2019.

DOMINGUEZ-LOPEZ; HOWELL, Rebecca; GOBBI, Gabriella. Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: implications for major depression. **Rev. Neuroscience**. v. 23, n. 4, p. 429–443, 2012.

DUCOTTET, Cecile; GRIEBEL, Guy; BELZUNG, Catherine. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. **Progress in**

**Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 4, p. 625–631, 2003.

DUMAN, Ronald S; MONTEGGIA, Lisa M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **BIOL PSYCHIATRY**, 2006.

DUNLOP, Boadie W; NEMEROFF, Charles B. The Role of Dopamine in the Pathophysiology of Depression. **Arch. Psychiatry**.v. 64, 2007.

DUNN, Adrian J; SWIERGIEL, Artur H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, p. 688–693, 2005.

EDWARD COFFEY, C; WILKINSON, William E.; WEINER, Richard. Quantitative cerebral anatomy in depression. **JAMA Psychiatry**, v. 50, p. 7–16, 1993. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/article-abstract/496011>>.

FAKHOURY, Marc. Revisiting the Serotonin Hypothesis: Implications for Major Depressive Disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 5, p. 2778–2786, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9152-z>>.

FAKHRAEI, Nahid; MOUSAVI, seyyedeh elaheh; PISSHVA, seyed pouyan; *et al.* Nanocurcumine Ameliorates Lipopolysaccharide-induced Depressive-like Behavior in Mice. **Nanomed Res**, v. 3, n. 2, p. 58–64, 2018.

FERNANDES, Joneth; GUPTA, Girdhari Lal. N-acetylcysteine attenuates neuroinflammation associated depressive behavior induced by chronic unpredictable mild stress in rat. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 356–365, 2019.

FERREIRA MELLO, Bruna Stefânia; MONTE, Aline Santos; MCINTYRE, Roger S.; *et al.* Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1521–1529, 2013.

FEUILLET, Christian. Lectotypifications of six taxa in the Boraginales (Cordiaceae and Heliotropiaceae). **PhytoKeys**, v. 62, n. March 1943, p. 95–100, 2016.

FIGUEIRÓ, M.; ILHA, J.; LINCK, V. M.; *et al.* The Amazonian herbal Marapuama attenuates cognitive impairment and neuroglial degeneration in a mouse Alzheimer model. **Phytomedicine**, v. 18, n. 4, p. 327–333, 2011.

GARCIA, Lêda S B; COMIM, Clarissa M; VALVASSORI, Samira S; *et al.* Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. v. 32, p. 140–144, 2008.

GARCIA, Lêda S B; COMIM, Clarissa M; VALVASSORI, Samira S; *et al.* Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 450–455, 2009.

GIRIDHARAN, VV, RÉUS, GZ, SELVARAJ, S., SCAINI, G., BARICHELLO, T., & QUEVEDO, J. Maternal deprivation increases microglial activation and neuroinflammatory markers in the prefrontal cortex and hippocampus of infant rats. **Journal of Psychiatric Research**. 2019.

GONULALAN, Ekrem M.; NEMUTLU, Emirhan; BAYAZEID, Omer; *et al.* Metabolomics and proteomics profiles of some medicinal plants and correlation with BDNF activity. **Phytomedicine**, p. 152920, 2019.

GOTTSCHLING, M.; HILGER, H. H.; WOLF, M.; *et al.* Secondary structure of the ITS1 transcript and its application in a reconstruction of the phylogeny of Boraginales. **Plant Biology**, v. 3, n. 6, p. 629–636, 2001.

GOTTSCHLING, Marc; MILLER, James S.; WEIGEND, Maximilian; *et al.* Congruence of a phylogeny of Cordiaceae (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with morphology, ecology, and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, n. 3, p. 425–437, 2005.

HALL, Calvin S. Emotional Behavior in the Rat. **Journal of comparative psychology**, v. 18, n. 5, p. 385–403, 1941.

HABR, Soraya Ferreira; BERNARDI, Maria Martha; CONCEIÇÃO, Isaltino Marcelo; *et al.* Open field behavior and intra-nucleus accumbens dopamine release in vivo in virgin and lactating rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 115–121, 2011.

HAROON, Ebrahim; RAISON, Charles L; MILLER, Andrew H. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 137–162, 2011.

IOSET, Jean Robert; MARSTON, Andrew; GUPTA, Mahabir P.; *et al.* Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 5, p. 613–617, 2000.

ISINGRINI, Elsa; CAMUS, Vincent; LE GUIQUET, Anne Marie; *et al.* Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

JIANG, Xi; LIU, Ji; LIN, Qian; *et al.* Proanthocyanidin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice via neuroinflammatory pathway. **Brain Research Bulletin**, v. 135, n. June, p. 40–46, 2017.

KANG, Hee-ju; KIM, Ju-wan; KIM, Seon-young; *et al.* The MAKE Biomarker Discovery for Enhancing antidepressant Treatment Effect and Response (MAKE BETTER) Study: Design and Methodology. 2018.

KARIM, Nasiara; KHAN, Imran; ABDELHALIM, Abeer; *et al.* Antidepressant potential of novel flavonoids derivatives from sweet violet (*Viola odorata* L): Pharmacological, biochemical and computational evidences for possible involvement of serotonergic mechanism. **Fitoterapia**, v. 128, n. April, p. 148–161, 2018.

KAZAK, Filiz; YARIM, Gul Fatma. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice: Involvement of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience Letters**, v. 658, p. 32–36, 2017.

KESSLER, Ronald C.; BROMET, Evelyn J. The epidemiology of depression across cultures. **Annual Review of Public Health**, v. 34, p. 119–138, 2013.

KIRSTEN, Thiago B.; GALVÃO, Marcella C.; REIS-SILVA, Thiago M.; *et al.* Zinc prevents sickness behavior induced by lipopolysaccharides after a stress challenge in rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

KUMAR, Ajay; SINGH, Swati; KUMAR, Anant; *et al.* Chemical composition, bactericidal kinetics, mechanism of action, and anti-inflammatory activity of *Isodon melissoides* (Benth.) H. Hara essential oil. **Natural Product Research**, p. 1–6, 2019.

KUROYANAGI, Masanori; KAWAHARA, Nobuo; SEKITA, Setsuko; *et al.* Dammarane-Type Triterpenes from the Brazilian Medicinal Plant *Cordia multispicata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1307–1312, 2003.

KUROYANAGI, Masanori; SEKI, Takahiro; HAYASHI, Tatsuo; *et al.* Anti-androgenic Triterpenoids from the Brazilian Medicinal Plant, *Cordia multispicata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 8, p. 954–957, 2001.

LANGHANS, Wolfgang. Bacterial products and the control of ingestive behavior: Clinical implications. **Nutrition**, v. 12, n. 5, p. 303–315, 1996.

LEE, Bombi; SHIM, Insop; LEE, Hyejung; *et al.* Gypenosides attenuate lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and anxiety-like behaviors in rats. **neurobiology & physiology**, v. 22, n. 5, p. 305–316, 2018.

LENER, Marc S; KADRIU, Bashkim; THERAPEUTICS, Experimental; *et al.* HHS Public Access. v. 77, n. 4, p. 381–401, 2018.

LEVINE, J.; BARAK, Y.; CHENGAPPA, K.N.R.; *et al.* Cerebrospinal Cytokine Levels in. **Neuropsychobiology**, v. 40, p. 171–176, 1999.

LI, Dan Dan; XIE, Hang; DU, Yi Feng; *et al.* Antidepressant-like effect of zileuton is accompanied by hippocampal neuroinflammation reduction and CREB/BDNF



upregulation in lipopolysaccharide-challenged mice. **Journal of Affective Disorders**, v. 227, n. October, p. 672–680, 2017.

LIEBERKNECHT, Stella; Vicente; PE, Mauricio. Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. **Behavioural Brain Research** jou, v. 320, p. 365–373, 2017..

LOPES K, Oliveira J, SOUSA-JUNIOR FJC, SANTOS TdF, ANDRADE D, ANDRADE SL, PEREIRA WL, Gomes PWP, MONTEIRO MC, SILVA CYY, da Silva MN, MAIA CF e FONTES-JÚNIOR EA. Chemical Composition, Toxicity, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activity of Dry Aqueous Extract of *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi (Cordiaceae) Leaves. **Front. Pharmacol.** 10:1376.2019.

LU, Yanxia; HO, Cyrus S.; LIU, Xin; *et al.* Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–14, 2017.

MACQUEEN, Glenda M.; CAMPBELL, Stephanie; MCEWEN, Bruce S.; *et al.* Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1387–1392, 2003.

MALHI, Gin S.; MANN, J. John. Depression. **The Lancet**, v. 392, n. 10161, p. 2299–2312, 2018.

MAMMANA, Santa; FAGONE, Paolo; CAVALLI, Eugenio; *et al.* The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer ' s Disease , Amyotrophic Lateral Sclerosis , and Multiple Sclerosis : Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. **Molecular Sciences**, v. 19, p. 1–20, 2018.

MANSARI, Mostafa El; GUIARD, Bruno P; CHERNOLOZ, Olga; *et al.* Relevance of Norepinephrine – Dopamine Interactions in the Treatment of Major Depressive Disorder. v. 16, p. 1–17, 2010.

MATIAS, Edinardo Fagner Ferreira; ALVES, Erivania Ferreira; SILVA, Maria Karollyna do Nascimento; *et al.* The genus *Cordia*: Botanists, ethno, chemical

and pharmacological aspects. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 5, p. 542–552, 2015.

MATSUO, Koji; HARADA, Kenichiro; FUJITA, Yusuke; *et al.* Distinctive Neuroanatomical Substrates for Depression in Bipolar Disorder versus Major Depressive Disorder. **CEREBRAL CORTEX**, n. January 2018, p. 1–13, 2017.

MAURER-SPUREJ, Elisabeth; PITTENDREIGH, Cheryl; MISRI, Shaila. Platelet serotonin levels support depression scores for women with postpartum depression. v. 32, n. 1, p. 23–29, 2007.

MILLER, James S. New Boraginaceae from Tropical America 4: Three New Species of *Cordia* from South America. **Novon**, v. 11, n. 4, p. 421, 2006.

MILLER, James S. New Boraginales from Tropical America 5: New Names and Typifications for Neotropical Species of *Cordia* and *Varronia*. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 17, n. 3, p. 372, 2008.

MIRANDA DE MELO, José Iranildo. Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae sensu lato. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 109–120, 2012.

MORAES, M T; GALV, Marcella C; CABRAL, Danilo; *et al.* Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway. p. 1–18, 2017.

NICIU, J.mark; IONESCU, f. dawn; RICHARDS, m. erica; *et al.* Glutamate and its receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. **J. Neural transm.**, v. 121, n. 8, p. 907–924, 2015.

NIMMERJAHN, Axel; KIRCHHOFF, Frank; HELMCHEN, Fritjof. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. 2005. **Resting Micr. Science**, v. 308, n. May, p. 1314–1319, 2005.

O'CALLAGHAN, James P.; SRIRAM, Krishnan; MILLER, Diane B. Defining “neuroinflammation”: Lessons from MPTP- and methamphetamine-induced neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1139, p. 318–330, 2008.

OHGI, Yuta; FUTAMURA, Takashi; KIKUCHI, Tetsuro; *et al.* Pharmacology , Biochemistry and Behavior Effects of antidepressants on alterations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 4, p. 853–859, 2013.

Osborne, P., Mataga, N., Onoe, H., & Watanabe, Y. Behavioral activation by stimulation of a GABAergic mechanism in the preoptic area of rat. *Neuroscience Letters*, 158(2), 201-204. 1993.

OTTE, Christian; GOLD, Stefan M.; PENNING, Brenda W.; *et al.* Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. Mdd, p. 1–21, 2016. PLASTICITY, Synaptic. *HHS Public Access*. v. 21, n. 3, p. 454–464, 2017.

PACKER, L.; GLAZER, A. R. Oxygen radicals in biological systems: Preface. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1947, p. 121–126, 1990.

PARK, Glacier National; HALL, Myrna H P. Modeled Climate-Induced Glacier Change in Glacier National Park, 1850 – 2100. **BioScience**, v. 53, n. 2, p. 131–140, 2015.

PIATO AL, Detanico BC, JESUS JF, Lhullier F, NUNES DS, Elisabetsky E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties. **J Ethnopharmacol.**;v. 2 (23): 300–4. 2008.

PORSOLT; M, Le Pichon; M, Jalfre. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. April, p. 730–732, 1977.

RAETZ, CHRISTIAN R. H. AND WHITFIELD, Chris. Lipopolysaccharide Endotoxins Christian. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635–700, 2002.

RAETZ, Christian R. H.; GARRETT, Teresa A.; REYNOLDS, C. Michael; SHAW, Walter A.; Moore, Jeff D.; JR, Dale C. Smith; RIBEIRO, Anthony A.; MURPHY, Robert C.; ULEVITCH, Richard J.; FEARNES, Colleen; REICHAERT, Donna; GLASS, Christopher K.; BENNER, Chris; SUBRAMANIAM, Shankar; HARKEWICZ, Richard; BOWERS-GENTRY, Rebecca C.; BUCZYNSKI, Matthew W.; COOPER, Jennifer A.; DEEMS Raymond A.; DENNIS, Edward A.

Kdo2-Lipid A of *Escherichia coli*, a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 1097-1111, 2006.

RIETSCHEL, Ernst T.; KIRIKAE, Teruo; SCHADE, Ulrich S; *et al.* activity endotoxin: mOle ..: ar ships of struetui to and fction; LOM. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 2, p. 217–225, 1994.

RIVEST, Serge. Brain, behavior, and immunity. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, p. 13–19, 2003

RODRIGUES, Francisca Taciana Sousa; DE SOUZA, Marcos Romário Matos; LIMA, Camila Nayane de Carvalho; *et al.* Major depression model induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration: Long-lasting behavioral, neuroimmune and neuroprogressive alterations. **Journal of Psychiatric Research**, v. 107, n. October, p. 57–67, 2018.

SABEDRA SOUSA, Fernanda Severo; BIRMANN, Paloma Taborda; BAMPI, Suely Ribeiro; *et al.* Lipopolysaccharide-induced depressive-like, anxiogenic-like and hyperalgesic behavior is attenuated by acute administration of  $\alpha$ -(phenylselanyl) acetophenone in mice. **Neuropharmacology**, v. 146, p. 128–137, 2019.

SANACORA, gerard; ZARATE, CARLOS; KRYSTAL, John; *et al.* Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat rev drug Discov.**, v. 7, n. 5, p. 426–437, 2009.

SANTOS, Maria Clara Bottino Gonçalves; PINHO, Marcelo. Estratégias tecnológicas em transformação: um estudo da indústria farmacêutica brasileira. **Gestão & Produção**, v. 19, n. 2, p. 405–418, 2012.

SCHULZ D, Buddenberg T, Huston J. Extinction-induced “despair” in the watermaze, exploratory behavior and fear: Effects of chronic antidepressant treatment. **Neurobiology of Learning and Memory**.87:624-634.2007.

SETIAWAN, Elaine; WILSON, Alan A; MIZRAHI, Romina; *et al.* Increased Translocator Protein Distribution Volume, A Marker of Neuroinflammation, in the

Brain During Major Depressive Episodes HHS Public Access. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 268–275, 2015.

SHADRINA, Maria; BONDARENKO, Elena A.; SLOMINSKY, Petr A. Genetics factors in major depression disease. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, n. JUL, p. 1–18, 2018.

SKALLI, Souad; HASSIKOU, Rachida; ARAHOU, Moustapha. An ethnobotanical survey of medicinal plants used for diabetes treatment in Rabat, Morocco. **Heliyon**, v. 5, n. 3, p. e01421, 2019.

SUH, Jee; SCHNEIDER, Maiko Abel; MINUZZI, Luciano; *et al.* **US CR**. Cortical thickness in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, 2018.

THIBEAULT, I.; LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. **Journal of Comparative Neurology**, v.4, p.461–477, 2001.

TROUBAT, Romain; BARONE, Pascal; LEMAN, Samuel; *et al.* Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, n. February, p. 1–21, 2020.

TUIN, Annemarie; HUIZINGA-VAN DER VLAG, Aij; VAN LOENEN-WEEMAES, Anne-Miek M. A. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, p. G377–G385, 2005.

VISMARI, L; ALVES, J; PALERMO-NETO, J. Depressão , antidepressivos e sistema imune : um novo olhar sobre um velho problema Depression , antidepressants and immune system : a new look to an old problem. **Rev Psiq Clín**, 2008.

WANG, Peng; YANG, Yanjie; YANG, Xiuxian; *et al.* CREB1 gene polymorphisms combined with environmental risk factors increase susceptibility to major depressive disorder (MDD). **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 1, p. 906–913, 2015.

WANG, Yun; NI, Jing; ZHAI, Lingyan; *et al.* Inhibition of activated astrocyte ameliorates lipopolysaccharide- induced depressive-like behaviors. **Journal of Affective Disorders**, v. 242, n. July 2018, p. 52–59, 2019.

WEBER, Michael D.; GODBOUT, Jonathan P.; SHERIDAN, John F. Repeated Social Defeat, Neuroinflammation, and Behavior: Monocytes Carry the Signal. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 46–61, 2017..

WOELFER, Marie; KASTIES, Vanessa; KAHLFUSS, Sascha; *et al.* The role of depressive subtypes within the neuroinflammation hypothesis of Major Depressive Disorder. **Neuroscience**, 2018.

WONG, David T.; BYMASTER, Frank P.; ENGLEMAN, Eric A. Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: Twenty years since its first publication. **Life Sciences**, v. 57, n. 5, p. 411–441, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: WHO Press. 2004.

YAO, Wei; ZHANG, Ji Chun; DONG, Chao; *et al.* Effects of amygenone on serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 136, p. 7–12, 2015.

YU, Xu Ben; ZHANG, Hai Na; DAI, Ying; *et al.* Simvastatin prevents and ameliorates depressive behaviors via neuroinflammatory regulation in mice. **Journal of Affective Disorders**, v. 245, n. October 2018, p. 939–949, 2019.

ZARATE, carlos; DU, jing; QUIROZ, jorge; *et al.* Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **New yourk academy of sciences**, v. 7, p. 27–291, 2003.

ZHANG, Feng; ZHOU, Hui; WILSON, Belinda C.; *et al.* Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, p. S213–S217, 2011.

ZHANG, Xiao Ying; ZHANG, Li Ming; MI, Wei Dong; *et al.* Translocator protein ligand, YL-IPA08, attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behavior by promoting neural regeneration. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 11, p. 1937–1944, 2018.

ZHAO, Jiayi; BI, Wei; XIAO, Shu; *et al.* Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

ZHU, Lihong; BI, Wei; LU, Dan; *et al.* Regulation of ubiquitin-specific processing protease 8 suppresses neuroinflammation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 64, p. 74–83, 2015.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO VAR01 SOBRE O PROCESSO NEUROINFLAMATÓRIO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM RATOS.", protocolada sob o CEUA nº 2986170418 (ID 000858), sob a responsabilidade de **Enéas de Andrade Fontes Júnior e equipe; Felype da Silva Pereira; Enéas de Andrade Fontes Júnior; Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva; Milton Nascimento da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 24/05/2018.

We certify that the proposal "EFFECTS OF VAR01 ON LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED NEUROINFLAMMATORY PROCESS (LPS) IN RATS.", utilizing 70 Heterogenics rats (70 males), protocol number CEUA 2986170418 (ID 000858), under the responsibility of **Enéas de Andrade Fontes Júnior and team; Felype da Silva Pereira; Enéas de Andrade Fontes Júnior; Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva; Milton Nascimento da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 05/24/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2018 a 03/2020** Área: **Farmacologia da Inflamação E do Comportamento - Lafico**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **7 a 8 semanas**

N: **70**

Linhagem: **Rattus norvegicus/wistar**

Peso: **150 a 170 g**

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento - LAFICO**

Belé, 27 de maio de 2018

Prof. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Vanessa Joia de Mello  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará