



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Alexandre Augusto Barros Lataliza

**Investigação do efeito tipo-antidepressivo do ácido rosmarínico: foco especial na via de
sinalização dos receptores canabinoides e PPAR- γ**

Florianópolis
2021

Alexandre Augusto Barros Lataliza

Investigação do efeito tipo-antidepressivo do ácido rosmarínico: foco especial na via de sinalização dos receptores canabinoides e PPAR- γ

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lataliza, Alexandre Augusto Barros

Investigação do efeito tipo-antidepressivo do ácido
rosmarínico: foco especial na via de sinalização dos
receptores canabinoides e PPAR-? / Alexandre Augusto Barros
Lataliza ; orientador, Rafael Cypriano Dutra, 2021.
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Depressão. 3. Sistema
endocanabinoide. 4. Neuroinflamação. 5. Ácido rosmarínico.
I. Dutra, Rafael Cypriano. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
III. Título.

Alexandre Augusto Barros Lataliza

Investigação do efeito tipo-antidepressivo do ácido rosmarínico: foco especial na via de sinalização dos receptores canabinoides e PPAR- γ

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Rafael Cypriano Dutra, Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Hudson Caetano Polonini, Dr.

Instituição Global Innovation Manager - Fagron Nederland B.V.

Prof. Rafael Mariano de Bitencourt, Dr.

Instituição Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof.(a) Patrícia de Souza Brocardo, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Cristiane Ribeiro de Carvalho, Dr (a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Neurociências.

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC

Prof. Rafael Cypriano Dutra, Dr.

Orientador - UFSC

Florianópolis, 2021

*Aos meus queridos e amados pais, José Pedro e Maria Eliza,
e à Tia Sueli por sempre apoiarem e incentivarem
meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Diante de tantos desafios, mais um ciclo se finaliza. Com ele, o sentimento de gratidão extravasa e alguns personagens aqui devem ser destacados.

Inicialmente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências (PPG NEURO) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela excelência e comprometimento na formação de profissionais da educação, pesquisa e extensão.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos, bem como aos outros órgãos de fomento FAPESC, CNPq e INCT-INOVAMED.

Ao Professor Dr. Rafael Cypriano Dutra, por aceitar o desafio de me orientar nessa caminhada e proporcionar o desenvolvimento de novas habilidades na pesquisa científica. Experiências únicas foram vividas durante esse convívio e, com certeza, o profissional que me torno hoje é fruto de sua dedicação e esforço em extrair sempre o melhor dos seus alunos.

Ainda no âmbito de profissionais referência na minha trajetória, agradeço imensamente à Professora Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo, do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS) pela parceria no desenvolvimento do projeto, pelo incentivo, dedicação e zelo por seus eternos alunos.

Nesse momento, é de extrema gratidão que devo mencionar o nosso querido e amado Professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, que hoje permanece em nossos corações e memória, e foi peça fundamental para o desenvolvimento desse projeto. Foi pouco o convívio, porém não deixou de ser menos marcante. Seu amor pela educação, pelo prazer em lecionar e seu legado como pesquisador será eternizado.

Aos Professores Dr Rafael Mariano, Dr. Hudson Polonini, Dra Patricia Brocardo e a Dra Cristiane Ribeiro de Carvalho por aceitarem o convite como membros da banca avaliadora. Obrigado pela disponibilidade e parceria.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF/UFSC), Eduarda, Gabriela, Rodrigo, Jaíne, Mariana e Amanda. De maneira especial, à Larissa Laurindo, por iniciar o desenvolvimento desse projeto ao qual fui capaz de dar prosseguimento. À Elaine Dalazen, pela pró-atividade, por sempre se dispor a compartilhar o conhecimento, pelas conversas e conselhos. Ao Carlos Martins, grande parceiro e amigo além do laboratório, pelo convívio, incentivo e por me motivar a seguir sempre em frente. Aqui, também agradeço imensamente à amiga Pollyana Mendonça, do NUPICS, pelo incentivo, conselhos e pela participação ativa durante a escrita do artigo fruto desse projeto.

Aos amigos discentes do programa e que carrego para a vida, Luiza, Gislaine, Fernanda, bem como a casa e amigos que me acolheram em Florianópolis durante o período

de realização das disciplinas (Luzia, Orlando, Juliano, Natália, Yan e Raffael). À amiga e conselheira Letícia Galant. Eterna gratidão a todos vocês.

Aos amigos Juizforanos que se fizeram presente mesmo na distância. Em especial, minha parceira de vida Fernanda Fidelis, Rafaela Ferreira, João Paulo Vilela, Geovany Gabriel, Raphaela Oliveira e Lívia Mara. Às da graduação que permanecem presente, Stephane Calixto e Ana Caroline Lopes. E às de infância, Gláucia e Laura, que estão sempre acompanhando de perto minhas conquistas. Amo vocês!

Aos seres incríveis que chamo de pais: José Pedro e Maria Eliza. Palavras não serão suficientes para expressar minha gratidão, alegria e amor pelo que vocês representam. Se estou aqui finalizando mais uma etapa, grande parcela é pelo incentivo, motivação, apoio, paz e amor que é passado por vocês mesmo na distância. Aos meus irmãos, Lucas e André, cunhadas Carla e Samanta, e sobrinhas Manuelle, Larissa e Gabriella, pelo apoio e motivação. À amada Tia Sueli, grande mulher e referência em minha vida, eterna gratidão pelas nossas conversas, pelos conselhos, incentivo e por compor mais um alicerce da minha família. Ainda inseridos no meu vínculo familiar, agradeço imensamente ao companheiro de vida Felipe Dall'Agnol e à pequena Aurora, que suportaram/suportam minha personalidade peculiar, por me apoiarem e entenderem meu período de ausência.

Agradeço, por fim, à Deus pela força nos momentos de fraqueza, por colocar pessoas de caráter e de bem na minha vida, por me fazer acreditar sempre em um mundo melhor. Agradeço por reger meus caminhos e escolhas e, principalmente, por me dar saúde para conseguir seguir em frente, com foco, força e fé!

*“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente
para e encara o medo de frente”*

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma patologia complexa, multifatorial e de alta prevalência mundial que afeta diretamente a qualidade de vida do indivíduo acometido. Dentre as opções terapêuticas disponíveis, a farmacoterapia ainda é a mais utilizada na prática clínica. No entanto, esses fármacos estão relacionados à uma resposta lenta ou incompleta e, comumente, apresentam efeitos adversos. Além disso, cerca de 2/3 dos pacientes apresentam resistência à terapia medicamentosa. Nesse contexto, moléculas bioativas de origem vegetal se tornam nicho promissor para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos candidatos a fármacos e/ou terapias adjuvantes. O ácido rosmarínico (AR), éster do ácido cafeico e do ácido 3,4 dihidroxifenil lático, está intimamente associado às atividades anti-inflamatória e neuroprotetora. Assim, o desenvolvimento do presente estudo tem por objetivo investigar o efeito tipo-antidepressivo do AR e o papel da via de sinalização mediada pelos receptores canabinoides/receptor ativado por proliferador de peroxissomos (PPAR- γ) nesse efeito. Inicialmente foi realizada abordagem *in silico* para obtenção do perfil farmacocinético e predição dos possíveis alvos moleculares de ligação do AR. Em seguida foi realizada abordagem *in vitro* para obtenção do perfil antioxidante, através do método de sequestro de espécies reativas de oxigênio (DPPH) e a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase pelo método colorimétrico de Ellman. Por fim, a atividade tipo-antidepressiva foi realizada em modelo de neuroinflamação através da administração periférica de lipopolissacarídeo (LPS), sendo que a influência dos receptores canabinoides e PPAR- γ foi realizada por meio da administração dos antagonistas AM251/AM630 e GW9662, respectivamente. Testes comportamentais, incluindo teste de suspensão pela cauda (TSC), *splash test* (ST) e teste de campo aberto (TCA) foram realizados durante os protocolos experimentais para avaliações do comportamento tipo-depressivo e comprometimento motor. O AR apresentou características farmacocinéticas satisfatórias de absorção e permeação, de acordo com a regra dos 5 de Lipinski e o filtro de Ghose. Ainda foi possível identificar os alvos moleculares de ligação e atividades biológicas do AR, que incluem os receptores canabinoides CB1R e CB2R e o PPAR- γ . A abordagem *in vitro* destacou a atividade antioxidante ($CI_{50} = 0,916 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$), bem como o AR inibiu cerca de 58% da atividade da enzima acetilcolinesterase ($CI_{50} = 1,614 \mu\text{g/mL}$). Os protocolos experimentais com o AR (50 mg/kg, v.o.) agudo e repetitivo preventivo, assim como o tratamento terapêutico indicaram o efeito tipo-antidepressivo através da redução significativa no tempo de imobilidade no TSC e aumento no tempo de *grooming* no ST, sem comprometimento locomotor no TCA. O pré-tratamento com os antagonistas CB1R (AM251, 1 mg/kg) e CB2R (AM630, 1 mg/kg), bem como do PPAR- γ (GW9662, 1 mg/kg) preveniram o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo AR. Em conjunto, esses dados sugerem que as vias de sinalização dos receptores canabinoides/PPAR- γ estão envolvidas no efeito tipo-antidepressivo do AR. Além disso, os dados preliminares desse estudo indicam características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas favoráveis à biodisponibilidade, tornando esse composto potencial candidato a fármaco. Por fim, o AR constitui uma alternativa promissora e inovadora para futura inserção no planejamento terapêutico do TDM.

Palavras-chave: ácido rosmarínico; transtorno depressivo maior; comportamento tipo-antidepressivo; composto canabimimético; neuroinflamação; bioinformática.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is a complex, multifactorial and has high prevalence in worldwide that affect directly the individual's quality of life. Among therapies approach available, pharmacotherapy is the most used in the clinical practice. However, these drugs have slowly response or incomplete, as well as shows numerous adverse effects. Moreover, about 2/3 of patients are resistant to drug therapy. In this sense, biological compounds of natural source became a promising field to discovery new potential molecules and/or adjuvants to MDD's therapy. Rosmarinic acid (RA), ester of caffeic acid and 3, 4-dihydroxyphenyllactic acid, is closely related to distinct biological activities, including anti-inflammatory and neuroprotective actions. Then, this study investigated the antidepressant-like effect of RA and the whole of cannabinoid receptors/peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) signaling pathway in this sense. Firstly, *in-silico* approaches were performed to identify the RA's pharmacokinetic profile and potential molecular targets. *In vitro* tests were used to evaluation of antioxidant (DPPH method) and acetylcholinesterase activity (Ellmann's test). Finally, the antidepressant-like activity of RA was performed in the LPS-induced depression model. The behavioral test included tail suspension test (TST), splash test (ST) and open field test (OFT). RA (MW = 360.31 g/mol) meets the criteria of both Lipinski's rule of 5 and the Ghose filter and it also attends relevant pharmacokinetic parameters with great absorption and permeation profile. Target prediction analysis identified potential targets and biological activities for RA, including the PPAR- γ and the cannabinoid receptors CB₁ and CB₂. *In vitro* approaches indicate suitable antioxidant activity (IC₅₀ = 0.916 \pm 0.11 μ g/mL), as well as showed 58% acetylcholinesterase activity inhibition (IC₅₀ = 1.614 μ g/mL). The antidepressant-like effect of AR (50 mg/kg, p.o) in the acute and repetitive preventive and therapeutic protocols indicated significantly reduction in immobility time in the TST and increased the grooming time in ST, without locomotor impairment in OFT. Further, the pre-treatment with antagonists of CB1R (AM251, 1 mg/kg), CB2R (AM630, 1 mg/kg), and PPAR- γ (GW9662, 1 mg/kg) receptors significantly blocked the antidepressant-like effect of RA. Altogether, our findings suggest that cannabinoid receptors/PPAR- γ signaling pathways are involved with the antidepressant-like effect of RA. Moreover, preliminary data of this study, indicate that this compound meets important physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters that favor its bioavailability. RA constitutes a promising and innovative molecule for future insertion in the pharmacotherapy of MDD.

Keywords: Rosmarinic acid; polyphenol; major depressive disorder, antidepressant-like behavior; cannabimimetic compound; neuroinflammation; bioinformatics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fatores neuropatológicos que contribuem para o desenvolvimento da depressão e, conseqüentemente da neurodegeneração.....	25
Figura 2. Principais vias de inervação dos neurotransmissores monoaminérgicos no sistema nervoso central.....	26
Figura 3. Envolvimento das citocinas no processo neuroinflamatório e a interferência nos neurocircuitos, os quais em conjunto contribuem para o desenvolvimento e progressão do TDM.....	28
Figura 4. Esquema representativo do reflexo inflamatório.....	30
Figura 5. Esquema representativo da membrana interna e externa de bactérias Gram-negativas.....	32
Figura 6. Sinalização celular envolvida na resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo (LPS).....	34
Figura 7. Critérios de diagnóstico do TDM de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5).....	35
Figura 8. Vias de síntese e degradação dos dois principais endocanabinoides, araquidonoil-etanolamina (anandamida, AEA) e 2 araquidonoil-glicerol (2-AG).....	39
Figura 9. Atividade neuromoduladora do receptor canabinoide tipo 1 (CB1).....	41
Figura 10. Representação esquemática das principais particularidades e mecanismos fisiológicos dos receptores canabinoides tipo 1 (CB1) e canabinoides tipo 2 (CB2), destacando os potenciais alvos terapêuticos no sistema endocanabinoide.....	42
Figura 11. Estrutura química do ácido rosmarínico e seus precursores.....	46
Figura 12. Delineamento experimental da avaliação do efeito tipo-antidepressivo do AR no modelo experimental de depressão induzida por LPS.....	54
Figura 13. Efeito <i>per se</i> do tratamento com AR no comportamento tipo-depressivo dos animais.....	60
Figura 14. Efeito do tratamento preventivo e agudo com AR (50 mg/kg, v.o.) e imipramina (20 mg/kg, i.p.) no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS.....	62
Figura 15. Influência do tratamento preventivo repetido do AR no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS.....	63
Figura 16. Influência do tratamento terapêutico com AR no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS.....	64
Figura 17. Envolvimento dos receptores CB1 e CB2 no efeito tipo-antidepressivo do	

AR.....	65
Figura 18. Envolvimento da via de sinalização dependente do fator de transcrição PPAR- γ no efeito tipo-antidepressivo do AR.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros da regra dos cinco de Lipinski e filtro de Ghose do AR obtido do servidor online <i>Swiss ADME</i>	56
Tabela 2. Perfil <i>in silico</i> do AR nas etapas de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade obtido das plataformas online <i>Swiss ADME</i> e <i>ADMET-SAR</i>	57
Tabela 3. Potenciais alvos moleculares do AR obtido das plataformas online <i>Swiss Target Prediction</i> e <i>PASS online</i>	58
Tabela 4. Atividade antioxidante do ácido rosmarínico e do resveratrol.....	59
Tabela 5. Atividade inibitória da enzima AChE pelo AR.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2 araquidonoil-glicerol
5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AEA	Anandamida ou araquidonoil-etanolamina
AP1	Proteína ativadora 1
APA	<i>American Psychiatric Association Practice Guidelines</i>
AR	Ácido rosmarínico
BAI1	Inibidor de angiogênese específico do cérebro (do inglês <i>brain-specific angiogenesis inhibitor 1</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BH4	Tetrahidrobiopterina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico (do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CANMAT	<i>Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments</i>
CB1R	Receptor canabinoide tipo 1
CB2R	Receptor canabinoide tipo 2
CD14	Complexo de diferenciação 14
CE ₅₀	Concentração efetiva de 50%
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
COX-2	Ciclo-oxigenase tipo 2
DA	Dopamina
DAG	2-araquidonoil-diacilglicerol
DAGL- α	Diacilglicerol lipase – α
DAGL- β	Diacilglicerol lipase – β
DEH	Dose equivalente em humano
DL ₅₀	Dose letal de 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Doença de Parkinson

DPPH	<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
DSM – 5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição (do inglês <i>Diagnostic and statistical manual of mental disorders</i> – 5ªEd)
ERK	<i>Extracellular-regulated kinase</i>
ERK1/2	Cinase extracelular 1/2
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAAH	Hidrolase amida de ácido graxo (do inglês - <i>fatty acid amide hydrolase</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico (do inglês <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Sistema harmonizado global (do inglês <i>Globally Harmonized System</i>)
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
ICSI	<i>Institute for Clinical Systems Improvement</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- α	Interferon- α
IL-6	Interleucina-6
iMAO	Inibidores da monoamina oxidase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IRAK	Enzima cinase associada ao receptor IL-1 (do inglês <i>IL-1 receptor-associated kinase</i>)
JAK2	Proteína janus kinase 2
LPB	Proteína de ligação de lipídeos (do inglês <i>lipid-binding protein</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
MAGL	Monoacilglicerol lipase (do inglês <i>monoacylglycerol lipase</i>)
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MMP-2	Matrix metaloproteinase tipo 2
MPTP	<i>1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>

NAPE	N-acilfosfatidiletanolamina (do inglês <i>N-acylphosphatidylethanolamine</i>)
NAPE-PLD	NAPE fosfolipase D (do inglês <i>N-acylphosphatidylethanolamine-phospholipase D</i>)
NE	Noradrenalina
NF	Teste do nado forçado
NF-κB	Fator nuclear κB
NGF	Fator de crescimento do nervo (do inglês <i>nerve growth factor</i>)
NK	<i>Natural killer</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain-containing protein 3</i>
NLRs	Receptor do domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (do inglês <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i>)
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritróide relacionado ao fator 2 (do inglês <i>nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno (do inglês <i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PGE-2	Prostaglandina E2
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomos (do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>)
RO5	Regra dos 5
RXR	Receptor de ácido retinóico X (RXR, do inglês <i>retinoid X receptor</i>)
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNRI	Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (do inglês <i>serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SSRI	Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (do inglês <i>serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors</i>)
ST	<i>Splash test</i>

TCA	Teste de campo aberto
TDM	Transtorno depressivo maior
TGF β	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês <i>transforming growth factor beta</i>)
TIRAP	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein</i>
TLR4/MD-2	Receptor <i>toll-like</i> 4/fator de diferenciação mielóide 2
TLRs	Receptor tipo <i>toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis fator</i>)
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
TRPV1	Receptor de potencial transitório de vanilóide tipo 1 (do inglês <i>transient receptor potential vanilloid</i>)
TSC	Teste de suspensão pela cauda
v.o.	Via oral
VCAM-1	Proteína de adesão celular vascular tipo 1 (do inglês <i>vascular cell adhesion protein 1</i>)
VTA	Área tegumentar ventral (do inglês <i>ventral tegmental área</i>)
α 7 nAChR	Receptores de acetilcolina α 7 nicotínicos
Δ 9THC	Δ 9-tetrahidrocanabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 DEPRESSÃO	23
2.1.1 Fisiopatologia	23
2.1.1.1 <i>Hipótese monoaminérgica</i>	25
2.1.1.2 <i>Hipótese neuroinflamatória</i>	27
2.1.1.2.1 Vias de comunicação entre o SNP e o SNC	29
2.1.1.2.2 Modelo de depressão induzido por LPS	31
2.1.2 Diagnóstico	34
2.1.3 Tratamento	36
2.2 SISTEMA ENDOCANABINOIDE	38
2.2.1 Ligantes endógenos	38
2.2.2 Receptores canabinoides	40
2.2.2.1 <i>Receptor PPAR-γ: via não clássica de ação dos endocanabinoides</i>	42
2.2.3 Sistema endocanabinoide e TDM	44
2.3 ÁCIDO ROSMARÍNICO	45
2.3.1 Ácido rosmarínico e depressão	47
3 JUSTIFICATIVA	48
4 HIPÓTESE	49
5 OBJETIVOS	49
5.1 OBJETIVO GERAL	49
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
6 MATERIAL E MÉTODOS	50
6.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	50
6.1.1 Dados primários e forma canônica SMILES	50
6.1.2 Perfil ADMET	50
6.1.3 Predição de alvos moleculares	50
6.2 PROTOCOLOS <i>IN VITRO</i>	51
6.2.1 Atividade antioxidante	51
6.2.2 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)	51
6.3 MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR LPS	52
6.3.1 Animais	52
6.3.2 Modelo experimental – depressão induzida por LPS	52

6.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	54
6.4.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	54
6.4.2 Teste de <i>splash</i> (ST).....	55
6.4.3 Teste do campo aberto (TCA).....	55
6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
7 RESULTADOS.....	55
7.1 AVALIAÇÃO ADMET E ALVOS DE LIGAÇÃO DO AR	55
7.2 PROTOCOLOS <i>IN VITRO</i>	59
7.2.1 Avaliação do potencial antioxidante.....	59
7.2.2 Efeito inibitório do AR na atividade da AChE.....	59
7.3 PROTOCOLOS <i>IN VIVO</i>	60
7.3.1 Efeito do tratamento preventivo e terapêutico com AR no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS.....	60
7.3.2 Envolvimento da sinalização dependente dos receptores canabinoides e PPAR-γ no efeito tipo-antidepressivo do AR.....	64
8 DISCUSSÃO	66
9 CONCLUSÃO	78
REFERENCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um distúrbio neuropsiquiátrico crônico que acomete grande parte da população mundial e, associado aos custos de tratamento e reinserção desses indivíduos ao mercado de trabalho, acarreta importantes despesas econômicas aos Estados (CAMARGO; RODRIGUES, 2019; SHEEHAN *et al.*, 2017). Os sintomas clínicos são caracterizados por tristeza profunda e humor irritável, os quais estão acompanhados por mudanças somáticas (dificuldade ao respirar, fadiga, distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça, e neuropatias periféricas) ou cognitivas (concentração, memória, motivação), os quais irão afetar a funcionalidade do indivíduo acometido (GRAHEK *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019; MORA *et al.*, 2018). Devido ao fato desses sintomas não serem patognomônicos da depressão, os mesmos são evidenciados também em outras doenças neuropsiquiátricas, dificultando ainda mais o diagnóstico clínico da doença (MALHI; MANN, 2018).

Embora a fisiopatologia do TDM não esteja completamente elucidada, existem diferentes teorias que caracterizam os sintomas depressivos observados em indivíduos com essa patologia (PAZINI; CUNHA; RODRIGUES, 2019), incluindo a teoria monoaminérgica, (FERRARI; VILLA, 2016; SHAO; ZHU, 2020); disfunções associadas ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018); e alterações da homeostase entre o sistema imunológico central e periférico, a qual justifica a hipótese neuroinflamatória (PITSILLOU *et al.*, 2019). Além dessas teorias citadas, outros mecanismos podem justificar o desenvolvimento da depressão, como fatores genéticos (LIMA-OJEDA; RUPPRECHT; BAGHAI, 2018), disfunção glutamatérgica (HILLHOUSE; PORTER, 2015), alterações nos fatores neurotróficos relacionados à neuroplasticidade e a modulação do sistema endocanabinoide (ATHIRA *et al.*, 2020).

O esquema terapêutico do TDM se baseia em duas abordagens principais, a psicoterapia e a farmacoterapia. A primeira se refere à aplicação de metodologias baseadas em princípios psicológicos que visam à mudança comportamental, cognitiva, emocional e/ou características pessoais do indivíduo (CUIJPERS *et al.*, 2019). Já a farmacoterapia foi introduzida com o desenvolvimento dos fármacos inibidores da monoamina oxidase (iMAO) e dos antidepressivos tricíclicos para o tratamento da depressão. Com a evolução da pesquisa científica no campo de antidepressivos foram estabelecidas novas classes de medicamentos, sendo eles os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (SSRI, do inglês *serotonina and norepinephrine reuptake inhibitors*) e os inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (SNRI, do inglês *serotonina-norepinephrine reuptake inhibitors*). Com o

objetivo de aumentar a concentração das monoaminas na fenda sináptica, todas as classes de medicamentos supracitadas são amplamente utilizadas na prática clínica (FATHINEZHAD *et al.*, 2019; SANTARSIERI; SCHWARTZ, 2015)

Apesar da disponibilidade e de diferentes mecanismos de ação dos fármacos antidepressivos, aproximadamente 2/3 dos pacientes não respondem ao tratamento inicial, fato que pode ser justificado pela variabilidade individual de resposta ao medicamento (fatores clínicos e vias biológicas) ou pela dificuldade de diagnóstico, comprometido pela escolha inadequada da terapia farmacológica (MORA *et al.*, 2018). Além desses fatos, esses fármacos apresentam efeitos adversos importantes, tais como alterações gastrointestinais, ansiedade e disfunções sexuais, principalmente relacionados ao rápido aumento das concentrações das monoaminas na fenda sináptica (FATHINEZHAD *et al.*, 2019). Dessa forma, o desenvolvimento de novos fármacos e/ou adjuvantes terapêuticos com maior eficácia, segurança e que apresentem vias alternativas de ação, faz-se necessário na prática clínica.

Nesse contexto, o sistema endocanabinoide se torna uma importante área de estudo, já que está inserido na manutenção e homeostase do organismo, bem como envolvido em diferentes fases do desenvolvimento de patologias relacionadas ao sistema nervoso central (SNC). Esse sistema exerce diferentes funções fisiológicas, dentre elas a modulação do apetite, dor, humor e memória (TRUSLER *et al.*, 2017). O receptor metabotrópico canabinoide tipo 1 (CB1R) está expresso principalmente no SNC em áreas relacionadas à memória, movimento e transmissão da dor. Por outro lado, o receptor canabinoide tipo 2 (CB2R) está expresso em órgãos linfoides periféricos, bem como na superfície de linfócito B, células *natural killer* (NK) e macrófagos/monócitos (HARUNA *et al.*, 2017). Esses receptores podem ser ativados por endocanabinoides, tais como o araquidonoiletanolamida (anandamida - AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), bem como por compostos de origem exógena, representado pelo Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), presente na *Cannabis sativa* e outras espécies do gênero *Cannabis* (KARSAK *et al.*, 2007). Em adição, duas enzimas principais são responsáveis pelo metabolismo dos endocanabinoides, a hidrolase amida de ácido graxo (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) e monoacilglicerol lipase (MAGL, do inglês *monoacylglycerol lipase*), respectivamente (TRUSLER *et al.*, 2017).

Devido à presença dos componentes do sistema endocanabinoide no SNC, esse influencia distintas áreas do cérebro relacionadas ao controle do eixo HPA, humor, ansiedade e comportamento (medo, aprendizado e recompensa) (IBARRA-LECUE *et al.*, 2018). Dessa forma, mudanças nesse sistema podem estar relacionadas ao desenvolvimento de sintomas

depressivos, tais como a deficiência do receptor CB1 (POLESZAK *et al.*, 2018) e redução da concentração dos endocanabinoides séricos (HILL *et al.*, 2008; MICALE *et al.*, 2015). Por outro lado, a intervenção através da administração de agonistas não específicos sintéticos CB1/2, agonistas seletivos CB1 e agentes que inibem a recaptação dos endocanabinoides, estão diretamente relacionados à atividade antidepressiva (ATHIRA *et al.*, 2020).

Diante do cenário de inúmeras possibilidades na área de desenvolvimento de moléculas bioativas com ação antidepressiva, os agonistas dos receptores ativados por proliferador de peroxissomos γ (PPAR- γ – do inglês *peroxisome proliferator-activated receptors*) se tornam importante alternativa para o tratamento de transtornos do humor. Esses são fatores de transcrição ativado por ligantes que formam complexos de heterodímeros com os receptores de ácido retinóico X (RXR, do inglês *retinoid X receptor*) (PRASHANTHA KUMAR *et al.*, 2020). Por meio da translocação para o núcleo celular, esses complexos se ligam a regiões específicas do DNA e regulam a transcrição de genes associados ao metabolismo de lipídeos e glicose, processos inflamatórios e diferenciação celular (COLLE *et al.*, 2016). Os receptores PPAR- γ são expressos em diversos tipos celulares, incluindo neurônios, astrócitos e micróglia, e algumas funções podem ser atribuídas a esse receptor, tais como a regulação da síntese de mediadores pró-resolução, a expressão de genes anti-inflamatórios, ativação da micróglia e modulação entre os seus diferentes fenótipos (VILLAPOL, 2018). Adicionado ao fato de que esses receptores podem ser ativados por ligantes canabinoides (receptor canabinoide não clássico), é possível sugerir que os receptores PPAR- γ estão intimamente associados à homeostase do SNC, com efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores, sendo também considerada uma via de ação alternativa para o tratamento de transtornos neuropsiquiátricos (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020).

Ante ao exposto, o ácido rosmarínico (AR) surge como um composto de origem vegetal promissor com perspectiva antidepressiva. Considerado um polifenol derivado do ácido cafeico e do ácido 3,4-dihidroxifenil láctico (ALAGAWANY *et al.*, 2017), o AR foi inicialmente isolado da espécie vegetal *Rosmarinus officinalis* e diferentes atividades biológicas são atribuídas a esse polifenol, tais como atividade antiviral, antibacteriana, antioxidante e antitumoral (LUO *et al.*, 2020), além de ação anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora, as quais tornam esse composto promissor na terapêutica de patologias relacionadas ao SNC. Lv e colaboradores (2019) evidenciaram o efeito anti-inflamatório do AR em modelo pré-clínico de doença de Parkinson. No estudo realizado por Hase e colaboradores (2019) foi observado efeito do AR em modelo pré-clínico de doença de Alzheimer, através da inibição da agregação da proteína β -amilóide, a qual pode estar

associada ao aumento de dopamina e redução da expressão da enzima monoamina oxidase b no SNC. Shang e colaboradores (2016), também observaram o efeito antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor do AR no modelo animal de lesão medular. Adicionalmente a essas atividades, o efeito antidepressivo do AR também já foi referenciado na literatura (ITO *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2013; TAKEDA *et al.*, 2002). Sendo assim, tais evidências sugerem que o AR está relacionado à possível atividade antidepressiva e que interferências no sistema endocanabinoide e em receptores PPAR- γ estão associadas à gênese do comportamento depressivo e ao controle das respostas imunoinflamatórias e neuromoduladoras. Portanto, o desenvolvimento desse estudo tem como premissa principal investigar o efeito tipo-antidepressivo do AR como novo ligante canabimimético, bem como investigar a participação do PPAR- γ nesse efeito usando o modelo de depressão induzida pela administração de LPS em camundongos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEPRESSÃO

O TDM é um complexo e recorrente problema de saúde pública com incidência em grande parcela da população mundial com estimativa global de 280 milhões de pacientes acometidos, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Nesse âmbito, os transtornos de humor apresentam maior prevalência em indivíduos do sexo feminino quando comparado ao sexo masculino. No Brasil foram registrados aproximadamente 11,5 milhões de casos de depressão, representando 5,8% da população brasileira (OMS, 2017).

Os sintomas característicos relacionados à TDM são humor depressivo, redução do interesse por atividades prazerosas (anedonia), prejuízo cognitivo, sentimento de culpa, inutilidade e ideação suicida, presentes também em outras condições psiquiátricas e neurodegenerativas, dificultando ainda mais o diagnóstico da depressão (GALTS *et al.*, 2019). Dessa forma, os prejuízos funcionais associados ao TDM resultam em dificuldade no relacionamento social e ocupacional, redução de rendimento no trabalho e na escola, perda do prazer, dificuldade de realizar atividades diárias em família e das responsabilidades familiares. Todos esses fatores associados refletem na diminuição da qualidade de vida do indivíduo e dificuldade em estabelecer relacionamentos interpessoais (SHEEHAN *et al.*, 2017).

2.1.1 Fisiopatologia

A etiologia e os circuitos neuroquímicos relacionados ao desenvolvimento da depressão não estão completamente elucidados, porém interações entre os fatores biológicos, psicológicos, genéticos, sociais e familiares podem ser destacados como possíveis desencadeadores da doença (VILLAS BOAS *et al.*, 2019). A alteração da função de áreas e circuitos cerebrais relacionadas à regulação do humor, emoção e sistema de recompensa pode estar relacionada ao desenvolvimento do TDM (RAHMAN; ALZAREA, 2019). Através de estudos *post mortem* e de neuroimagem, realizados em indivíduos diagnosticados com TDM, foi possível observar alterações em regiões cerebrais, mais especificamente, diminuição do volume da área cinzenta e da densidade glial no córtex pré-frontal e hipocampo. No entanto, esses trabalhos são inconclusivos, e geralmente a depressão pode estar associada a comorbidades e à utilização de diferentes medicamentos, dificultando assim o estabelecimento da relação causa e efeito com as alterações cerebrais e desenvolvimento do TDM (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Além das áreas cerebrais já citadas, outras regiões

também estão envolvidas no desenvolvimento do TDM, com destaque à amígdala, estriado ventromedial, núcleos do tálamo da linha média e mediodorsal, e ventral *pallidum*. Portanto, todas essas regiões parecem influenciar no comportamento depressivo, caracterizados por medo, ansiedade, humor, processamento do sistema de recompensa, atenção, motivação, respostas ao estresse, interação social e funções neurovegetativas, como sono, apetite, peso e libido (HAMON; BLIER, 2013; PRICE; DREVETS, 2012).

Evidências relatadas na literatura propõem diferentes teorias neurobiológicas que suportam a origem do TDM, sendo elas: i) hipótese monoaminérgica, com alteração da concentração de monoaminas, principalmente serotonina (5-HT), noradrenalina e dopamina no SNC; ii) hipótese neuroendócrina, por meio da interferência no eixo HPA, com aumento da produção e liberação dos glicocorticoides na corrente sanguínea; e iii) hipótese neuroinflamatória (OTTE *et al.*, 2016). Acrescentado a essas, outras teorias são propostas tais como a alteração na liberação dos neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) e a atrofia cerebral, através da diminuição do volume do córtex pré-frontal e hipocampo dos pacientes com TDM (WOHLEB *et al.*, 2016). A Figura 1 relaciona diferentes fatores biológicos que estão inseridos na fisiopatologia do TDM, bem como de outras patologias neurodegenerativas, como a doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington.

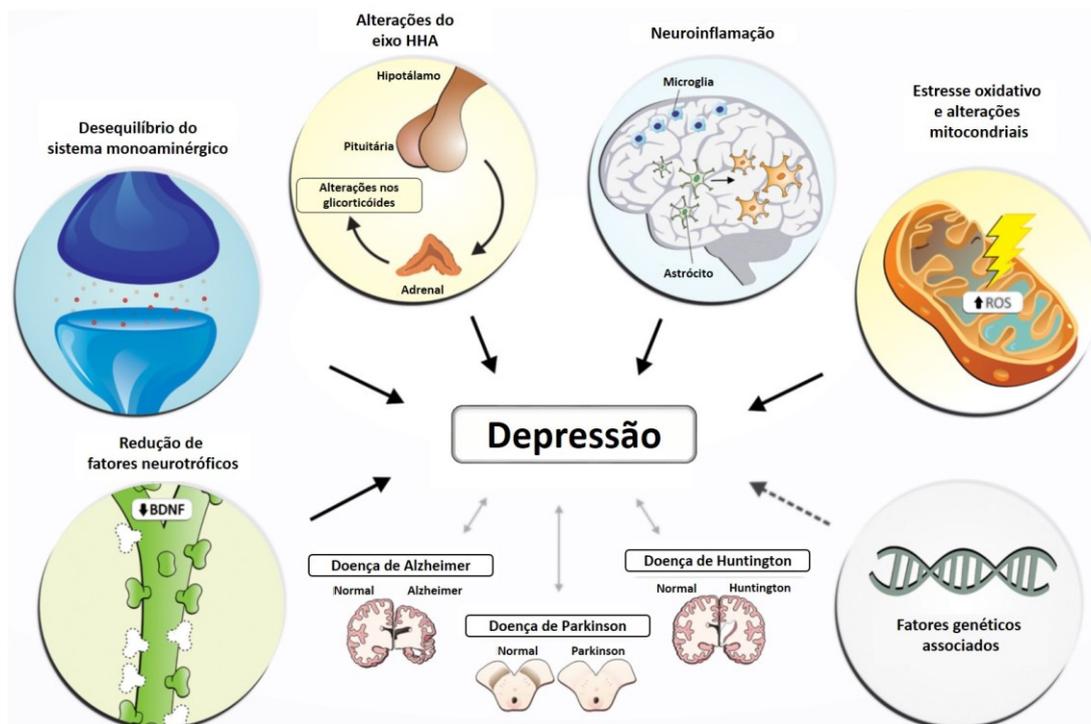


Figura 1. Principais fatores neuropatológicos que contribuem para o desenvolvimento da depressão e, consequentemente da neurodegeneração. O desequilíbrio do sistema monoaminérgico, alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), neuroinflamação, estresse oxidativo e a redução de fatores neurotróficos são considerados fatores etiológicos essenciais no desenvolvimento e/ou progressão de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington. Aliado a essas patologias, o TDM se apresenta como uma comorbidade (setas bidirecionais) e, juntamente com fatores genéticos associados (seta tracejada), compartilham fatores etiológicos semelhantes. Fonte: adaptado de GALTS e colaboradores, 2019.

2.1.1.1 Hipótese monoaminérgica

As monoaminas estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento do TDM, sendo esses neurotransmissores responsáveis pela manutenção de diferentes funções cerebrais. Os neurônios noradrenérgicos estão distribuídos no tronco encefálico e inervam diversas áreas cerebrais, modulando funções do córtex pré-frontal, processamento da memória de trabalho, regulação comportamental e atenção – Figura 2A (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018). Os neurônios serotoninérgicos partem do núcleo da rafe do tronco cerebral e se projetam para o cérebro e medula espinhal – Figura 2B – sendo a 5-HT responsável pela regulação de distintas funções cerebrais e emocionais, incluindo sono, cognição, nocicepção, ansiedade, humor, apetite e comportamento sexual (SZEITZ; BANDIERA, 2018). Por fim, outro neurotransmissor que desempenha importante papel na manutenção das funções cerebrais, é a dopamina. Os neurônios dopaminérgicos têm sua origem na área tegumentar ventral, substância *nigra* e hipotálamo, se projetando para o córtex e núcleo *accumbens*, estriado e hipófise, respectivamente – Figura 2C. A dopamina também exerce funções

essenciais no controle motor, memória espacial, motivação, sistema de recompensa, atenção, regulação do sono, dentre outras atividades fisiológicas (KLEIN *et al.*, 2019).

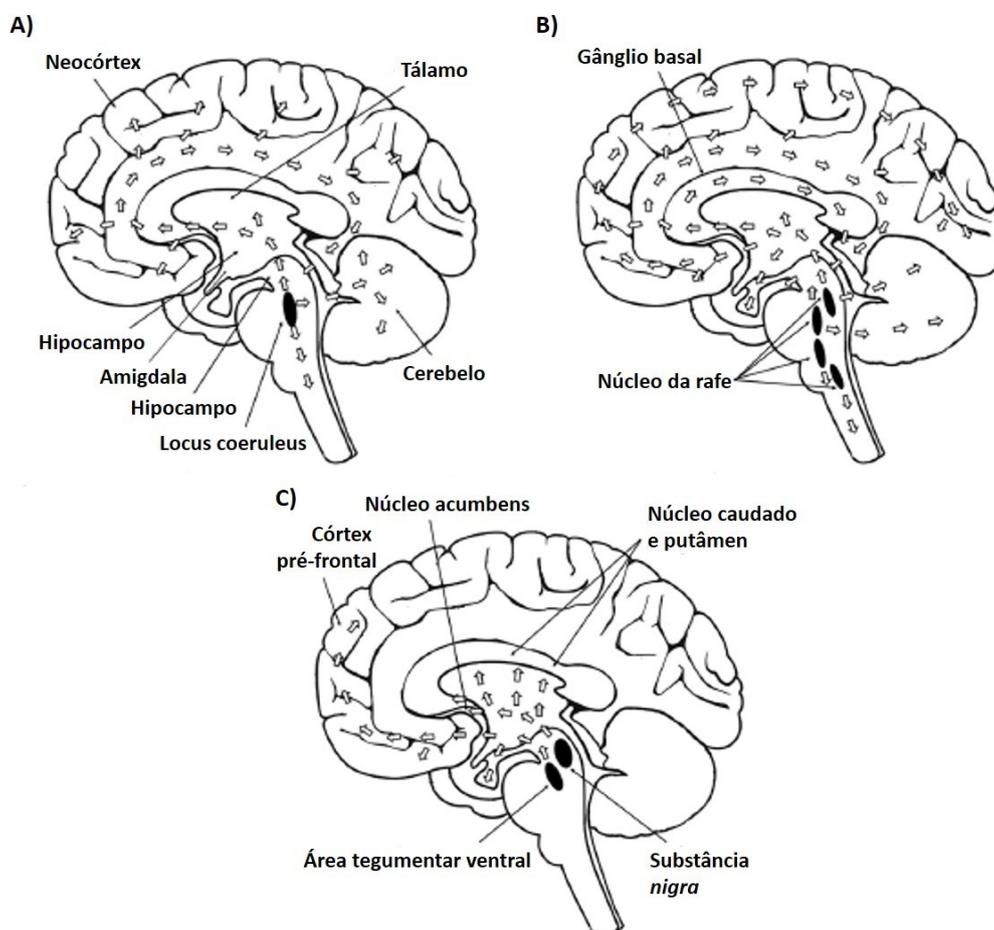


Figura 2. Principais vias de inervação dos neurotransmissores monoaminérgicos no sistema nervoso central. A partir do *locus coeruleus*, os neurônios noradrenérgicos se projetam para grande parte do encéfalo e da medula espinhal (A). Os neurônios serotoninérgicos estão localizados predominantemente no núcleo da rafe, da qual se espalham para diversas áreas cerebrais, incluindo córtex pré-frontal, estriado, hipotálamo e hipocampo (B). Os neurônios dopaminérgicos se projetam da substância *nigra* e da área tegumentar ventral formando a via córtico-basal-gânglio-tálamo-cortical. Portanto, a depleção e/ou desequilíbrio monoaminérgico no SNC está diretamente relacionado ao desenvolvimento da depressão. Fonte: adaptado de MARTINS e BRIJESH, 2018.

A teoria monoaminérgica no TDM está sustentada pela descoberta e proposição dos mecanismos de ação, na década de 1950, dos antidepressivos tricíclicos, responsáveis pelo bloqueio da recaptação de monoaminas no neurônio pré-sináptico; e dos inibidores da monoamina oxidase (iMAO), enzima responsável pela hidrólise desses neurotransmissores (OTTE *et al.*, 2016). Portanto, a hipótese monoaminérgica propõe que, em indivíduos diagnosticados com depressão, é evidenciada alteração nas concentrações de monoaminas no SNC (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

De acordo com a literatura, alguns mecanismos podem ser elencados para justificar o desequilíbrio dessas aminas biogênicas. Dentre eles, são propostos: i) a deficiência funcional dos neurotransmissores, a qual é evidenciada pela degradação dos mesmos pelas enzimas MAO; ii) diminuição do número de proteínas transportadores de membrana, o qual dificulta a recaptação do neurotransmissor e proporciona a exposição à enzimas de degradação; por fim, iii) anormalidades funcionais nos receptores podem alterar a afinidade da ligação neurotransmissor-receptor ou promover mudanças na cascata de segundo mensageiros desencadeados por essa ligação (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018).

2.1.1.2 Hipótese neuroinflamatória

A ativação de células do sistema imunológico e consequente alteração do perfil inflamatório representam importantes vias patofisiológicas do TDM (KÖHLER *et al.*, 2017). Dessa forma, modificações na resposta imune central e periférica podem influenciar mudanças neurobiológicas evidenciadas em indivíduos com esse transtorno (PITSILLOU *et al.*, 2019). As principais células responsáveis pela homeostase e pela rápida resposta a dano e infecção no SNC é a microglia, as quais são capazes de secretar citocinas que funcionam como moduladoras positivas e contribuem para a manutenção da neuroplasticidade. No entanto, a secreção prolongada ou em excesso de mediadores pró-inflamatórios provocam alterações das funções neuronais, prejudicando a sinalização, síntese, recaptação e liberação dos neurotransmissores. Portanto, a ativação do sistema imunológico no SNC afeta a rede de transmissão neuronal influenciando os quadros de humor e cognição (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020).

A hipótese neuroinflamatória é sustentada diante de algumas evidências. De acordo com a literatura, a inflamação crônica observada em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 e artrite reumatoide, pode induzir resposta adaptativa gerando sintomas depressivos, tais como letargia, anorexia, distúrbios de humor e sono (WOELFER *et al.*, 2019). Em adição, a administração de citocinas, tais como interferon- α (IFN- α) também pode originar quadros depressivos, como observado em indivíduos em tratamento para infecção do vírus da hepatite C e naqueles em terapia oncológica, com consequente aumento na concentração de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis fator*) (JEON; KIM, 2017). Além das evidências já citadas, a administração de lipopolissacarídeo (LPS) é capaz de aumentar a concentração sérica de TNF, bem como de IL-6, as quais estão intimamente associadas ao desenvolvimento de sintomas depressivos e ansiosos (WOELFER *et al.*, 2019). Estudos evidenciam a capacidade de mediadores pró-inflamatórios periféricos

atravessarem a barreira hematoencefálica e agirem diretamente em células residente do SNC, tais como astrócitos, micróglia e neurônios, contribuindo assim para o *status* neuroinflamatório (HODES *et al.*, 2015). Em adição a esses dados, pacientes com TDM apresentam aumento na concentração sérica de TNF e IL-6, bem como a análise *post-mortem*, indicaram neuroinflamação e ativação microglial (OTTE *et al.*, 2016). O esquema descrito na Figura 3 ilustra o envolvimento das respostas inflamatórias juntamente à interferência nos neurocircuitos, os quais em conjunto contribuem para o desenvolvimento e progressão dos sintomas depressivos em indivíduos acometidos com TDM.

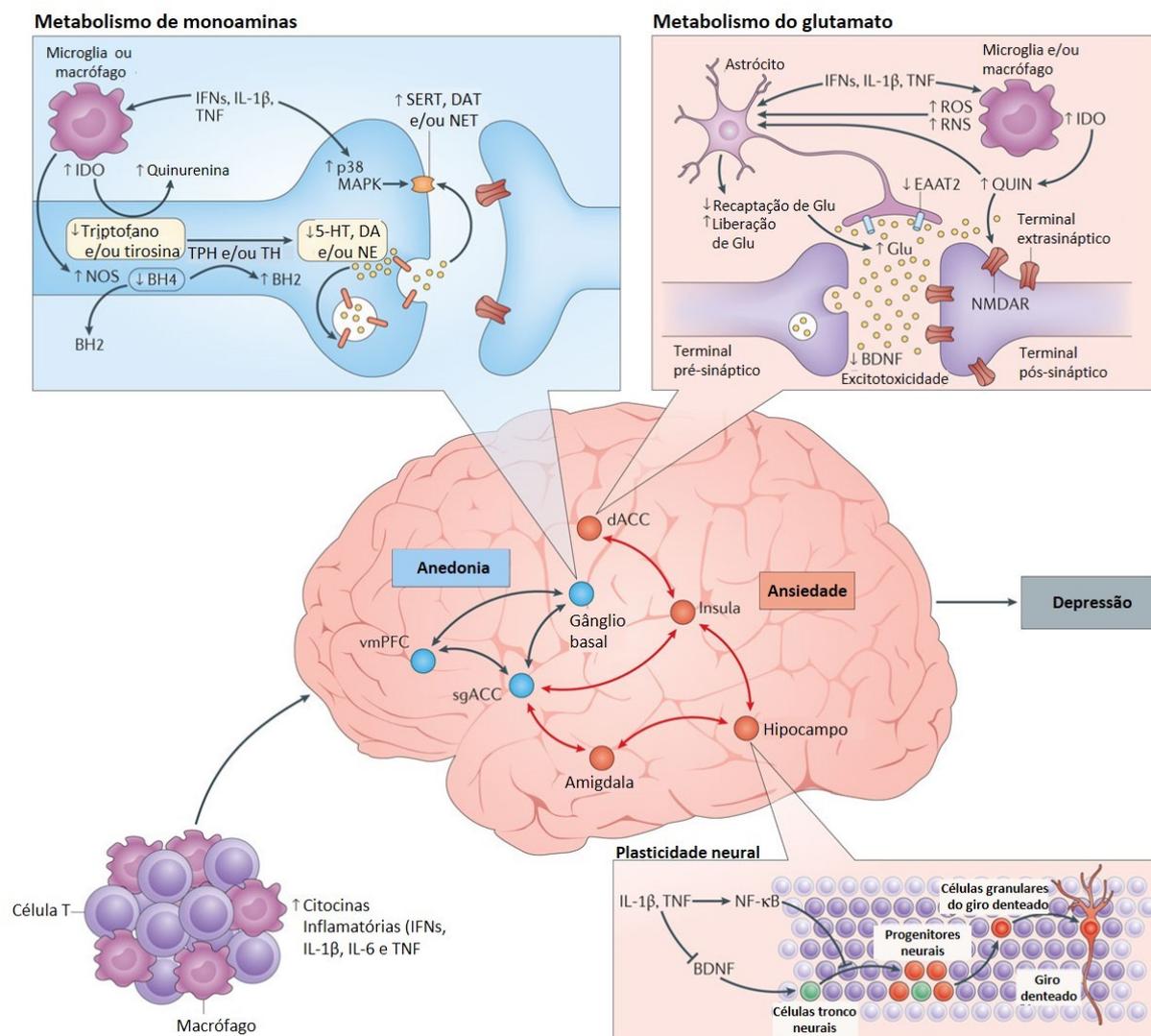


Figura 3. Envolvimento das citocinas no processo neuroinflamatório e a interferência nos neurocircuitos, os quais em conjunto contribuem para o desenvolvimento e progressão do TDM. No cérebro, a resposta inflamatória interfere com diferentes vias metabólicas e moleculares, as quais influenciam os sistemas de neurotransmissores afetando os neurocircuitos responsáveis pela regulação do comportamento, principalmente aqueles relacionados à motivação (anedonia), bem como evasão e atenção (ansiedade). Citocinas pró-inflamatórias, como os interferons subtipos I e II (IFNs), IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF) pode reduzir a biodisponibilidade de monoaminas – serotonina (5HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NE), através de dois mecanismos principais: i) aumento da expressão e função dos transportadores de recaptação desses

neurotransmissores via proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK); ou ii) redução da síntese, através da diminuição de co-fatores (tetrahidrobiopterina – BH4), a qual é sensível ao dano oxidativo e está envolvido na produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase. Além dessas ações, as citocinas pró-inflamatórias são capazes de diminuir os precursores das monoaminas por meio da ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), a qual é responsável pela hidrólise do triptofano, precursor da serotonina, em quinurenina. Essa por sua vez, ativa a micróglia, a qual converte quinurenina em ácido quinolínico, que se liga a receptores n-metil-d-aspartato (NMDAR) – receptor de glutamato (Glu). Através da redução da recaptação e estimulação da liberação de glutamato induzido pela ação das citocinas e pela ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), respectivamente, ocorre à diminuição da concentração do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e à excitotoxicidade. O processo inflamatório, principalmente no giro denteado do hipocampo, resulta na diminuição dos fatores de crescimento, os quais estão diretamente relacionados à neurogênese, potenciação em longo prazo e às ramificações dendríticas, envolvidas nos processos de aprendizagem e memória. Em adição, as citocinas afetam os sistemas de neurotransmissores, particularmente, a circuitaria dopaminérgica envolvida na motivação, anedonia e ansiedade. BH2, dihidrobiopterina; dACC, córtex cingulado anterior dorsal; DAT, transportador de dopamina; EAAT2, transportador de aminoácido excitatório 2; NET, transportador de noradrenalina; NF-κB, fator nuclear κB; SERT, transportador de serotonina; TH, tirosina hidroxilase; TPH, triptofano hidroxilase; vmPFC, córtex pré-frontal ventromedial. Fonte: Adaptado de MILLER e RAISON, 2016.

2.1.1.2.1 Vias de comunicação entre o SNP e o SNC

As citocinas pró-inflamatórias que atingem a corrente sanguínea, as quais são resultantes do processo inflamatório sistêmico, podem atingir o SNC por diferentes vias. Nesse sentido, um dos principais processos envolvidos na comunicação entre o sistema nervoso periférico (SNP) e o SNC é o reflexo inflamatório, que engloba as vias aferentes e eferentes do nervo vago (Figura 4), sendo responsável por realizar *feedback* negativo no sistema imunológico inato e manter a homeostase da resposta imune (MARTELLI; FARMER; YAO, 2016). Na via aferente do nervo vago há a expressão de receptores de citocinas e de reconhecimento de padrões, os quais são capazes de detectar produtos inflamatórios periféricos, que incluem citocinas, padrões moleculares associados à danos (DAMPs) e padrões moleculares associado à patógenos (PAMPs) (TANAKA *et al.*, 2019). As projeções do nervo vago culminam no núcleo do trato solitário e se comunica com outras regiões cerebrais, incluindo o núcleo do tronco encefálico, hipotálamo e prosencéfalo. Adicionalmente, essa via de sinalização está intimamente relacionada à resposta eferente colinérgica do nervo vago, a qual ativa os neurônios do núcleo motor dorsal, núcleo ambíguo e área postrema. As terminações nervosas eferentes atingem órgãos periféricos (incluindo baço, fígado, intestino, estômago e coração) e são capazes de modular a resposta imune, por exemplo, a supressão da resposta inflamatória (PAVLOV; TRACEY, 2012).

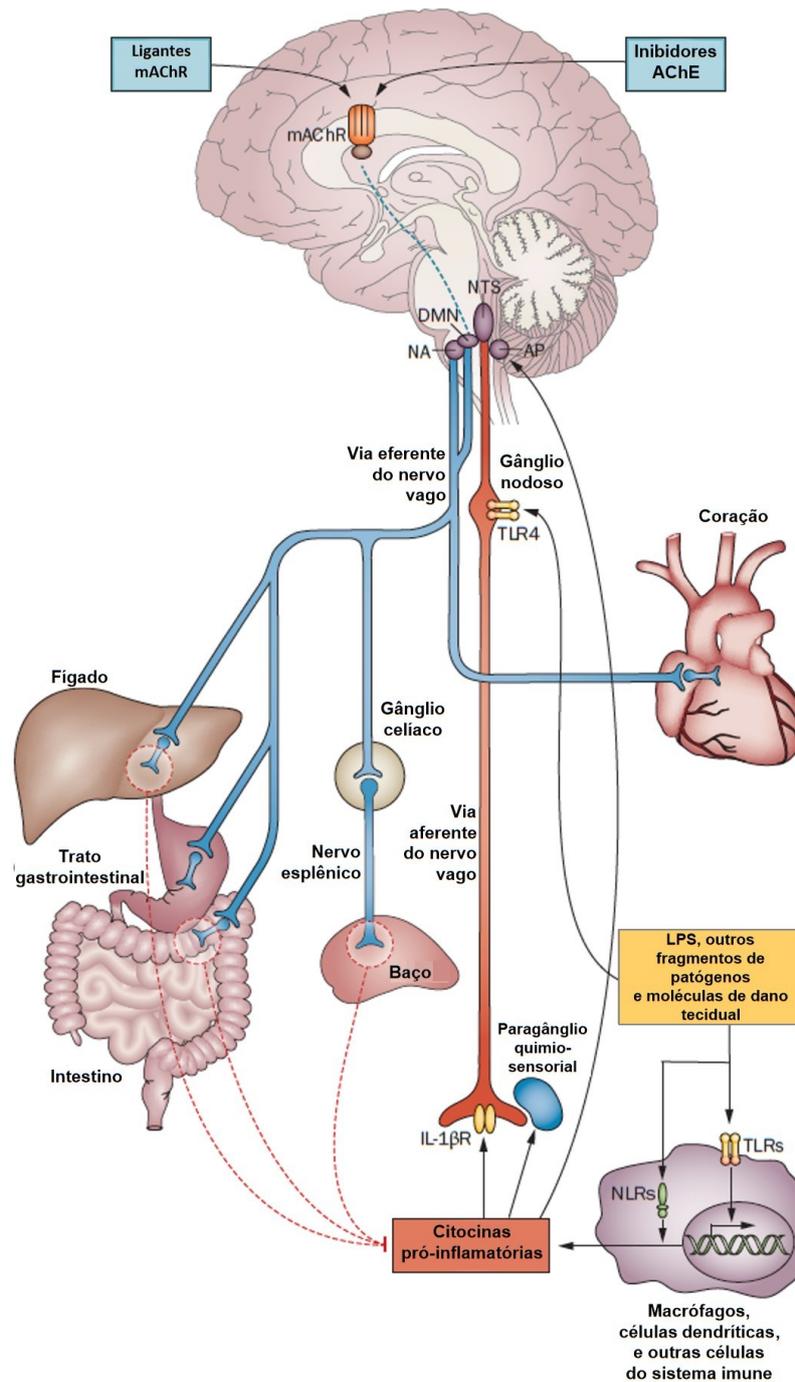


Figura 4. Esquema representativo do reflexo inflamatório. Receptores do tipo *toll-like* (TLRs) e do tipo domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs, do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) presentes na membrana de macrófagos, células dendríticas e outras células do sistema imunológico podem ser ativados por endotoxinas (LPS), fragmentos de patógenos e moléculas de dano tecidual. Nessa situação, ocorre a liberação de citocinas, as quais são detectadas pelos componentes sensoriais da via aferente do nervo vago (neurônio em vermelho). A progressiva cascata de sinalização promovida por esses mediadores culmina nas regiões cerebrais que incluem o núcleo do trato solitário (NTS), que possui interconexões com a área postrema (AP), núcleo motor dorsal do nervo vago (DMN), núcleo ambíguo (NA), bem como em regiões mais superiores do prosencéfalo. Dessa forma, as alterações inflamatórias originadas na periferia são processadas no SNC, e ativa a resposta inflamatória por meio da via eferente do nervo vago. Essa sinalização é caracterizada, principalmente, pela ativação do sistema colinérgico, o qual se projeta para órgãos periféricos, incluindo baço, fígado e trato gastrointestinal (neurônios em azul), e culmina com a supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Destaque importante na via eferente do reflexo inflamatório é que sua ativação pode ser realizada

através de ligantes de receptores muscarínicos colinérgicos (mAChR) e inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), como a galantamina. Fonte: adaptado de PAVLOV e TRACEY, 2012.

Considerado outro ponto de comunicação entre o sangue, líquido cefaloespinal e o parênquima cerebral, os órgãos circunventriculares são estruturas localizadas entre o terceiro e quarto ventrículo cerebral, podendo ser exemplificada pela área postrema, órgão subfornical e o órgão vasculoso da lâmina terminal (KIECKER, 2018). Essas regiões são caracterizadas pela presença de capilares sanguíneos fenestrados extensos e de alta permeabilidade devido à ausência da barreira hematoencefálica. Dessa forma, as substâncias produzidas na periferia que atingem a corrente sanguínea conseguem atravessar livremente para o SNC, tornando-o mais sensíveis às alterações periféricas, e essas informações são transferidas para outras regiões cerebrais, sendo considerado ponto de manutenção da homeostase do organismo (KIECKER, 2018; VERHEGGEN *et al.*, 2020). Por fim, outras vias de comunicação podem ser citadas como a sinalização via células endoteliais cerebrais e via células do sistema imunológico periféricos, relacionadas à ativação de células por TNF e IL-1 β , bem como através da expressão de moléculas de adesão, incluindo P-selectinas e proteína de adesão celular vascular tipo 1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion protein 1*) (D'MELLO; SWAIN, 2016). Portanto, os dados supracitados indicam que a resposta imune iniciada na periferia é capaz de atingir o SNC e provocar alterações na síntese de citocinas pró-inflamatórias e neurotransmissores (5-HT, dopamina e GABA), bem como na secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH, do inglês *corticotropin releasing hormone*), os quais estão intimamente relacionados à regulação do humor e comportamento (D'MELLO; SWAIN, 2016).

2.1.1.2.2 Modelo de depressão induzido por LPS

Com a estrutura bem estabelecida na literatura, o LPS é considerado um padrão molecular associado a patógeno (PAMP – do inglês *pathogen associated molecular pattern*), o qual é constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas (COCHET; PERI, 2017). Estruturalmente, o LPS é uma macromolécula constituída principalmente por três regiões, sendo elas i) lipídeo A, responsável pelo reconhecimento da molécula pelo sistema imunológico e desenvolvimento da resposta inflamatória; ii) núcleo ou *core* de oligossacarídeos, iii) antígeno O (Figura 5) (MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016).

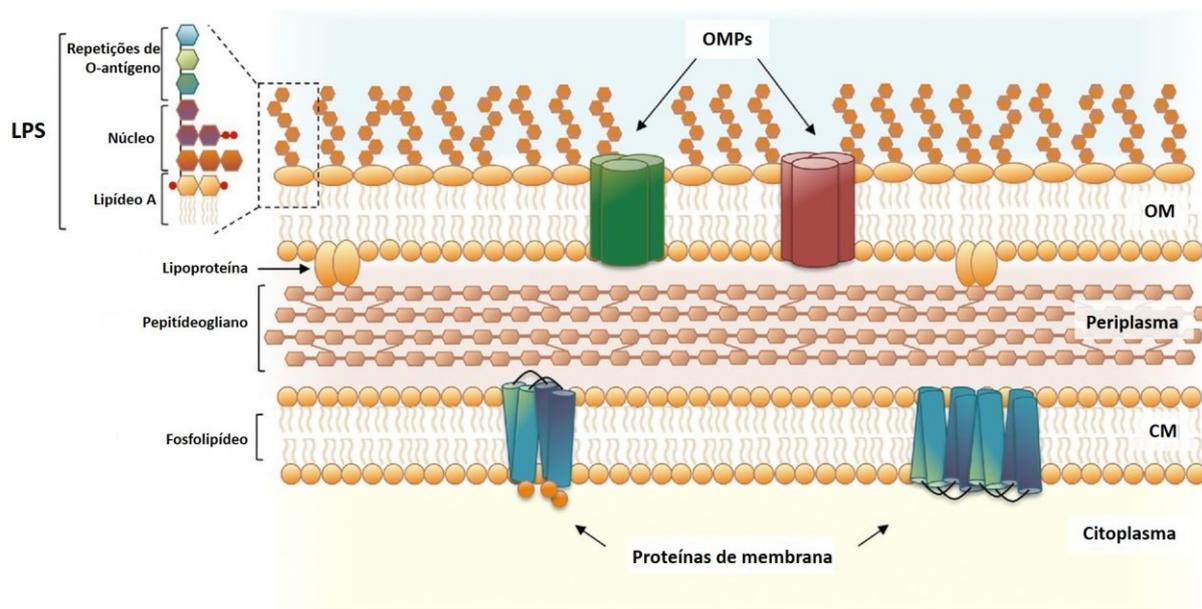


Figura 5. Esquema representativo da membrana interna e externa de bactérias Gram-negativas. A membrana externa (OM) de bactérias Gram negativas é caracterizada pela presença da bicamada lipídica e proteínas de membrana (OMPs), sendo que logo acima estão localizadas as moléculas de LPS. A segunda bicamada lipídica, mais interna, está em contato com o citoplasma (membrana citoplasmática – CM) e é constituída por fosfolípidios e proteínas de membrana. As duas membranas, interna e externa, são separadas por uma parede de peptídeo-glicano (periplasma), a qual também são encontradas enzimas hidrolíticas, proteínas de ligação e quimiorreceptores. Adaptado de MALDONADO, SÁ-CORREIA e VALVANO, 2016.

Devido ao seu caráter anfílico, o LPS se organiza em micelas quando em solução aquosa, sendo consideradas estruturas mais estáveis. O reconhecimento e sinalização do sistema imunológico frente a essa endotoxina se inicia por meio da ação da proteína de ligação de lipídeos (LPB, do inglês *lipid-binding protein*), a qual é responsável pela extração de um monômero de LPS do agregado micelar e consequente transferência para o complexo de diferenciação 14 (CD14). Ancorado na membrana plasmática da célula, o CD14 tem função de entregar a molécula de LPS para reconhecimento pelo complexo receptor *toll-like* 4/fator de diferenciação mielóide 2 (TLR4/MD-2) favorecendo a dimerização do mesmo (PARK; LEE, 2013). Dessa forma, a formação do complexo (TLR4/MD-2/LPS)₂ se torna a primeira etapa de inicialização da resposta imune inata.

Uma vez iniciada a cascata de sinalização intracelular, por meio da ativação do receptor TLR4/MD-2, existem duas vias distintas que convergem para a síntese de mediadores pró-inflamatórios. A primeira é caracterizada pela ativação do mitocôndrio, complexo proteico intimamente ligado ao receptor TLR4 constituído por TIRAP (*Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein*), molécula adaptadora de sinalização *myeloid differentiation primary response protein* 88 (MYD88) e enzima cinase associada ao receptor IL-1 (IRAK do inglês *IL-1 receptor-associated kinase*), resultando na

ativação dos fatores de transcrição inflamatórios, tais como fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína ativadora 1 (AP1) (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021). Já a segunda via caracteriza-se pela internalização do complexo TLR4/MD-2/LPS₂ e formação do endossoma, o qual é reconhecido pela complexo trifossoma, que inclui TRIF (*Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), o qual resulta na síntese de IFN, e também complementa a atividade via midossoma por meio da ativação do NF- κ B e AP1 (KIESER; KAGAN, 2017). Interessantemente, outra proteína de membrana que está associada à resposta ao LPS é o inibidor de angiogênese específico do cérebro (BAI1, do inglês *brain-specific angiogenesis inhibitor 1*). Esse receptor reconhece o núcleo de oligossacarídeo da endotoxina, promovendo a fagocitose da bactéria e consequente produção de EROs e culmina no estabelecimento do processo inflamatório (KIESER; KAGAN, 2017). Em adição à essas vias, o LPS também pode ser reconhecido no citosol, o qual atinge esse ambiente principalmente através da ruptura da membrana do fagossoma contendo o patógeno. O LPS intracelular é identificado pela caspase 11, a qual promove a ativação não canônica do inflamossoma NALP3, bem como a piroptose e liberação de IL-1 β (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021; KIESER; KAGAN, 2017). Portanto, são evidenciadas vias de sinalização distintas mediadas pelo reconhecimento celular do LPS, as quais convergem para o resultado final que é a formação do *status* inflamatório. A Figura 6 ilustra a detecção do LPS no meio extracelular e intracelular, bem como a cascata de sinalização resultante do reconhecimento dessa molécula pelas células do sistema imunológico.

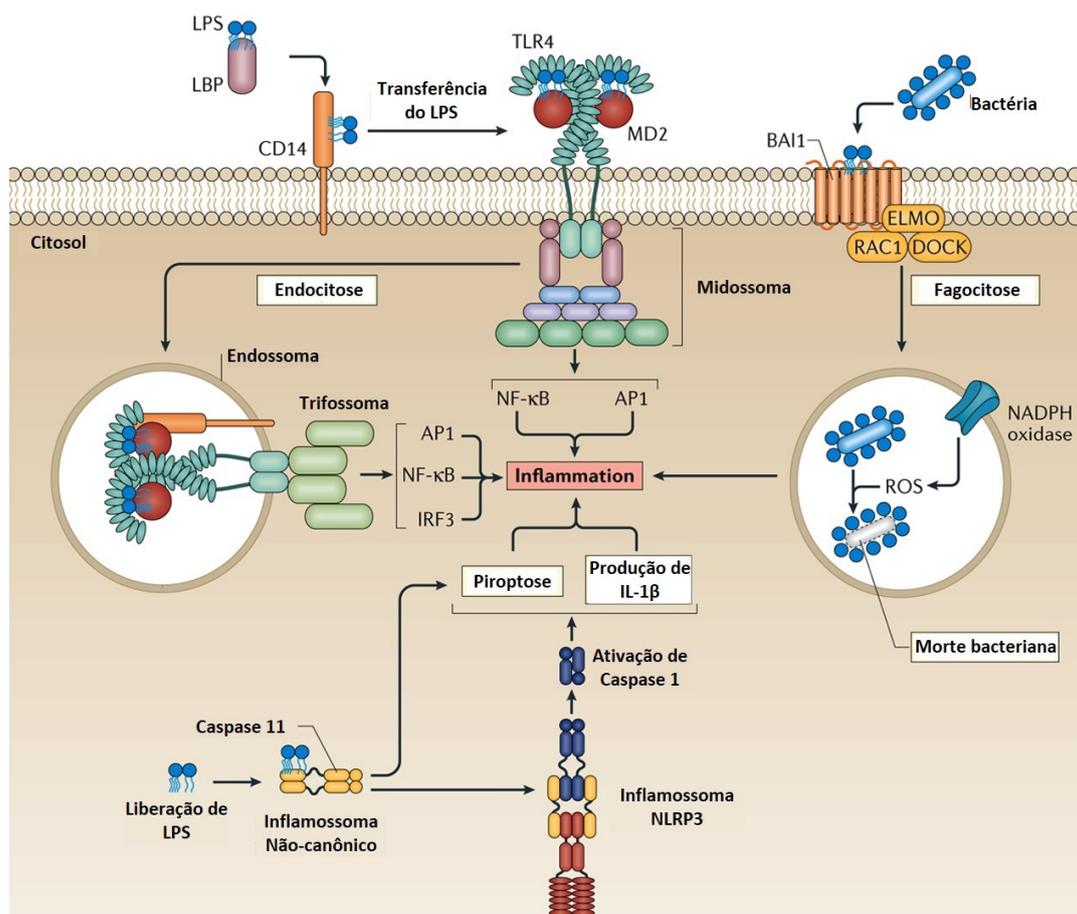


Figura 6. Sinalização celular envolvida na resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo (LPS). Através da identificação do LPS por receptores celulares, a resposta inflamatória pode seguir cinco vias de sinalização distintas. Inicialmente, o LPS é reconhecido no plasma sanguíneo pela proteína de ligação de lipídeos (LBP), a qual ajuda o receptor CD14 no processo de reconhecimento do LPS. O CD14 então é responsável pela transferência do LPS ao receptor *toll-like* 4 (TLR4)/MD2, promovendo a dimerização do mesmo e consequente ativação do TLR4. Esse processo leva à formação do midossoma que pode seguir duas vias de sinalização distintas: uma no sentido de ativação do NF-κB e AP1; e outra através da formação do endocitose do TLR4 ativado, que promove o reconhecimento pelo trifossoma seguindo a via de sinalização de IFN-β induzida por proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TRIF). Outro receptor capaz de reconhecer moléculas de LPS são inibidores de angiogênese específico do cérebro tipo 1 (BAI1). Nessa via, o LPS ativa o BAI1 e através da formação do complexo ELMO-DOCK-RAC1 promove a fagocitose da bactéria, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), indução da inflamação e morte bacteriana. Por fim, moléculas de LPS que atingem o citoplasma celular se ligam à caspase 11, induzindo à formação não canônica do inflamossoma, o que resulta na piroptose celular. Por outro lado, a ativação da caspase 11 também estimula a formação canônica de NALP3 - NLRP3, que culmina na síntese de IL-1β. Em conjunto, todas essas vias de sinalização são responsáveis pelo reconhecimento do LPS e ativação da cascata de segundos mensageiros que culmina no desenvolvimento do *status* inflamatório. Adaptado de KIESER e KAGAN, (2017). AP1, proteína ativadora 1; IRF3, fator regulatório de interferon 3; NF-κB, fator nuclear κB; NLRP3, NLR *family* *pyrin* *domain-containing* *protein* 3; TIR, receptor *toll*/interleucina 1.

2.1.2 Diagnóstico

O guia utilizado na prática clínica para o diagnóstico do TDM é o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição (DSM-5), no qual são descritos os critérios que auxiliam na correta caracterização da doença. De acordo com esse guia, o indivíduo será diagnosticado com TDM se apresentar, durante o período de duas semanas, cinco ou mais

sintomas característicos, sendo um deles obrigatoriamente o humor deprimido e/ou perda de interesse ou prazer. Outros critérios incluem: perda ou ganho significativo de peso; insônia ou hipersônia; agitação ou retardo psicomotor; fadiga ou perda de energia; sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva; capacidade diminuída de pensar ou se concentrar; e ideação suicida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). A Figura 7 descreve o esquema ilustrativo, no qual são destacados os critérios de diagnóstico DSM-5 e a subdivisão dos sintomas em fundamentais, emocionais, neurovegetativos e neurocognitivos.

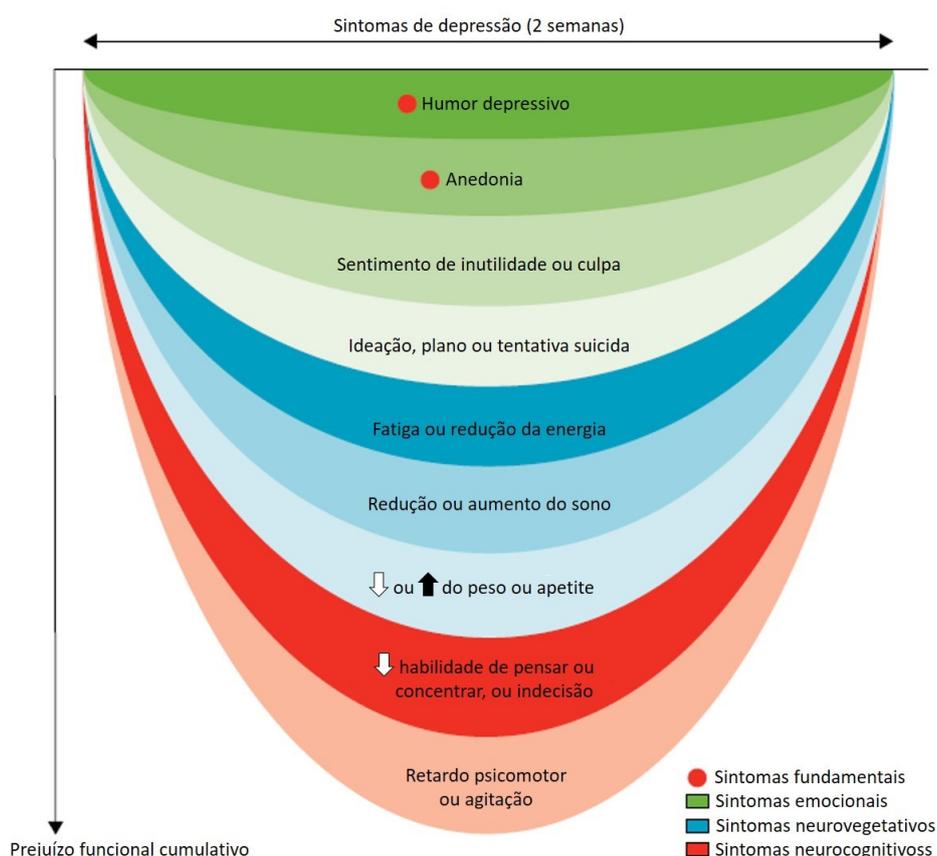


Figura 7. Critérios de diagnóstico do TDM de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5). Para o indivíduo ser diagnosticado com TDM é necessário apresentar cinco ou mais sintomas acima descritos durante o período de duas semanas, sendo no mínimo um deles caracterizado como sintoma fundamental. Adicionalmente a essas informações, os sintomas observados no TDM podem ser agrupados em fundamentais, emocionais, neurovegetativos e neurocognitivos. Adaptado de MALHI e MANN, 2018.

Contudo, o diagnóstico baseado em sintomas apresenta limitações devido ao fato de que o TDM é um transtorno de origem heterogênea e pode estar associado a outras doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e doença de Parkinson, bem como diabetes *mellitus* e câncer (PITSILLOU *et al.*, 2019). Além desses aspectos, os sintomas do TDM podem ser agrupados em emocionais, neurodegenerativos e cognitivos, os quais são evidenciados em outros transtornos psiquiátricos e comorbidades. Portanto, o diagnóstico e

classificação dessa patologia se tornam um desafio na clínica médica moderna (MALHI; MANN, 2018).

2.1.3 Tratamento

Com o objetivo de auxiliar no manejo terapêutico do TDM, diferentes guias foram publicados por grupos mundiais distintos. Esses documentos sofrem constantes alterações e reúnem informações obtidas através da aplicação de algoritmos e de estratégias sequenciais de tratamento, os quais têm como objetivo a padronização dos tratamentos e promoção da melhor escolha terapêutica para os pacientes. Alguns exemplos de instituições envolvidas no desenvolvimento dos protocolos terapêuticos para o TDM são: *American Psychiatric Association (APA) Practice Guidelines*, *Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT)*, *Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI) Healthcare Guideline for Major Depression in Adults in Primary Care*, além de outras instituições internacionais (KRAUS *et al.*, 2019).

O planejamento terapêutico do TDM objetiva reverter os sintomas depressivos e são utilizadas duas ferramentas principais na prática clínica: a terapia psicológica e/ou a farmacoterapia, sendo a escolha dependente da severidade dos episódios depressivos (MALHI; MANN, 2018). Nesse sentido, nos episódios leves é indicada apenas a psicoterapia; porém em casos classificados como moderados a severos são preconizados à administração de medicamentos, podendo ou não, estar associado à terapia psicológica (OTTE *et al.*, 2016).

A psicoterapia é caracterizada pela aplicação de métodos clínicos e posturas interpessoais realizadas através de princípios psicológicos estabelecidos, os quais visam à mudança de comportamento, cognição, emoção e/ou outras características que o paciente julgam necessárias. Essa modalidade terapêutica geralmente está associada ao cuidado primário de indivíduos com episódios depressivos leves e, dentre os principais tipos de intervenções psicológicas nesse âmbito, são destacadas a terapia cognitiva-comportamental, psicoterapia interpessoal, terapia de solução de problemas e aconselhamento não diretivo (CUIJPERS *et al.*, 2019).

No tratamento farmacológico, as medicações mais utilizadas na clínica atuam na via monoaminérgica, objetivando o aumento das concentrações de 5-HT, noradrenalina e dopamina na fenda sináptica (FATHINEZHAD *et al.*, 2019). Dessa forma, dentre as principais classes de medicamentos disponíveis para o tratamento do TDM, é possível destacar os antidepressivos tricíclicos, inibidores da MAO, inibidores seletivos de recaptação de 5-HT, inibidores da recaptação de 5-HT e noradrenalina e antidepressivos atípicos, os

quais podem ser exemplificados pelos fármacos imipramina, isocarboxazida, fluoxetina, duloxetina e mirtazepina, respectivamente (KENNEDY *et al.*, 2016; PITSILLOU *et al.*, 2019; SANTARSIERI; SCHWARTZ, 2015). Embora esses fármacos sejam amplamente incorporados no planejamento terapêutico do TDM, é importante ressaltar que apenas 1/3 dos pacientes respondem completamente ao tratamento, bem como é recomendada a prescrição inicial de doses baixas das medicações, a fim de minimizar possíveis efeitos adversos (PITSILLOU *et al.*, 2019).

Além das duas principais abordagens terapêuticas supracitadas, outras terapias não farmacológicas são disponibilizadas. Dentre essas opções, podem ser destacadas: a terapia eletroconvulsiva, indicada para sintomas severos e agudos, e quando a taxa de remissão é maior que a farmacoterapia tradicional; a estimulação magnética transcranial repetitiva, na qual os pulsos magnéticos gerados são capazes de originar potencial elétrico e despolarizar os neurônios de determinada região cerebral; e a estimulação vagal, na qual possui conexões com o sistema monoaminérgico no SNC e suas projeções são capazes de modular a liberação de neurotransmissores em regiões específicas do encéfalo responsáveis pelos sintomas da depressão (KUTZER *et al.*, 2020).

Dentro da pesquisa de novos fármacos antidepressivos, os quais objetivam menores efeitos adversos e maior especificidade, moléculas biologicamente ativas de origem vegetal se tornam uma alternativa promissora. Esses compostos podem regular a neurotransmissão através da ação direta em receptores específicos ou interferir na síntese e distribuição dos neurotransmissores (FATHINEZHAD *et al.*, 2019). No âmbito das plantas medicinais e fitocompostos com efeitos antidepressivos, já foram descritos na literatura estudos que evidenciaram tais efeitos. Alguns exemplos a destacar são: os derivados do floroglucinol, obtido da espécie vegetal *Hypericum caprifoliatum*, classificado como inibidor de recaptação de monoaminas; quercetina, presente no *Allium cepa*, com possível mecanismo referente à inibição da MAO; triterpenos obtidos da *Centella asiatica*, os quais estão envolvidos na modulação do eixo HPA e no aumento da concentração de neurotransmissores monoaminérgicos; e, além desses, são referenciados diversos outros compostos vegetais com ação antidepressiva (DERELI; ILHAN; AKKOL, 2018; MARTINS; BRIJESH, 2018). Outro material vegetal bastante estudado é o *Panax ginseng*, bem como seus constituintes exemplificados pelos ginsenosídeos, saponinas totais e sesquiterpenos. Em revisão sistemática realizada por Jin e colaboradores (2019) foram reunidos estudos evidenciando os efeitos antidepressivos dessa espécie vegetal, os quais possivelmente estão relacionados aos mecanismos no sistema monoaminérgico, eixo HPA, expressão de fatores neurotróficos e

sistema neuroimune. Ante ao exposto, torna-se evidente que as espécies vegetais são fontes importantes para a descoberta de novos compostos biologicamente ativos para o tratamento do TDM, bem como são consideradas ferramentas essenciais para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa patologia. Adicionalmente, pode ser considerado importante nicho de investimento da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos com vias de ação antidepressiva inovadoras.

2.2 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Os estudos do sistema endocanabinoide iniciaram-se com o isolamento do principal componente psicoativo da *Cannabis sativa*, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) por Gaoni e Mechoulam no ano de 1964. Em seguida, os pesquisadores buscaram entender os mecanismos pelo qual o Δ^9 -THC desenvolvia seus efeitos farmacológicos, culminando com a descoberta dos CB1R por Matsuda e colaboradores (1990), e do CB2R por Munro; Thomas e Abu-Shaar (1993). Dessa forma, definiu-se o conceito de canabinoides, os quais são moléculas capazes de modular os receptores canabinoides, sendo esses ligantes endógenos (endocanabinoides), sintéticos ou derivados do metabolismo secundários das plantas (os chamados fitocanabinoides) (GONÇALVES *et al.*, 2020a). Ainda, o sistema endocanabinoide é baseado em três pilares principais, a saber, os canabinoides endógenos, os receptores canabinoides e as enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos endocanabinoides (LU; MACKIE, 2016).

2.2.1 Ligantes endógenos

Os principais canabinoides endógenos estudados são a anandamia (N-araquidonoil-etanolamina – AEA) e o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG). Esses endocanabinoides são sintetizados sob demanda, através do aumento da concentração de cálcio intracelular. Além disso, os componentes essenciais e limitantes no processo de produção dessas substâncias são as enzimas que catalisam as reações de síntese (ZOU; KUMAR, 2018). A AEA é sintetizada pela hidrólise do fosfolípido de membrana N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE – do inglês *N-acylphosphatidylethanolamine*) pela enzima fosfolipase D-NAPE (NAPE-PLD – do inglês *NAPE-phospholipase D*) (KUMAR *et al.*, 2019). Em relação ao 2-AG, as principais enzimas envolvidas no processo de biossíntese são a diacilglicerol lipase – α (DAGL- α) e a DAGL- β , as quais catalisam a hidrólise do 2-araquidonoil-diacilglicerol (DAG), proveniente dos fosfolípidos da membrana plasmática, resultando na formação do 2-AG (SHARKEY;

WILEY, 2016). As vias de síntese e degradação desses dois principais canabinoides endógenos estão descritas na Figura 8.

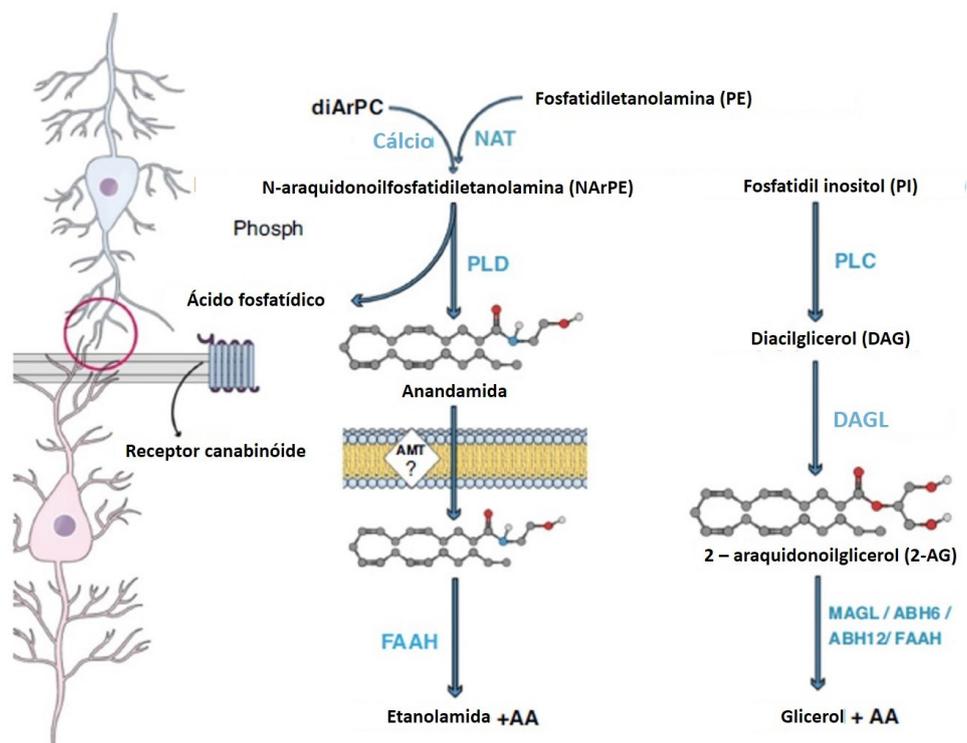


Figura 8. Vias de síntese e degradação dos dois principais endocanabinoides, araquidonoil-etanolamina (anandamida, AEA) e 2-araquidonoil-glicerol (2-AG). Inicialmente, os derivados de fosfolípidos de membrana araquidonoil-fosfatidilcolina (diArPC) e fosfatidiletanolamina (PE) são substratos para catálise da enzima N-aciltransferase (NAT), na presença de cálcio, resultando no produto intermediário N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE). Em seguida, esse composto é hidrolisado pela enzima específica fosfolipase D (NAPE-PLD), liberando a molécula de ácido fosfatídico e consequente formação da AEA. A degradação desse composto é realizada pela enzima hidrolase amida de ácido graxo (FAAH), na qual resulta a formação de etanolamida e ácido araquidônico (AA). Referente à síntese do 2-AG é necessário à conversão de fosfatidil inositol (PI) pela enzima fosfolipase C na formação de diacilglicerol (DAG). A partir dessa molécula como substrato e ação da diacilglicerol-lipase (DAGL), o produto 2-AG é sintetizado. Dessa forma, a principal enzima responsável pela inativação dessa molécula é a monoacilglicerol-lipase (MAGL), sendo os compostos resultantes dessa reação o glicerol e ácido araquidônico. Fonte: Adaptado de GONÇALVES e DUTRA, 2019.

Referente aos mecanismos das ações fisiológicas dos endocanabinoides, a AEA é classificada como agonista parcial dos receptores CB1 e CB2, com maior afinidade pelo primeiro. Já o 2-AG é referenciado como agonista total de ambos os receptores, e apresenta maior concentração no SNC quando comparado a AEA (WOODHAMS *et al.*, 2015). Além da interação com os receptores canabinoides, ambos os endocanabinoides podem se ligar de forma ortostérica ou alostérica a outros receptores, tais como GPR55, GPR18, GPR119, PPAR, receptor de potencial transitório de vanilóide tipo 1 (TRPV1 – do inglês *transient receptor potential vanilloid 1*), canais iônicos (Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+}), dentre outros alvos moleculares (MILANDO; FRIEDMAN, 2019; TOCZEK; MALINOWSKA, 2018). Ainda, de

acordo com a literatura, outros compostos considerados lipídeos bioativos endógenos são capazes de modular a ação dos receptores canabinoides direta ou indiretamente, incluindo oleoamida, n-palmitoiletanolamina, 2-araquidonoilglicerol éter, virodamina, n-araquidonoildopamina (AMBROSE; SIMMONS, 2019; KILARU; CHAPMA, 2020; PROSPÉRO-GARCÍA *et al.*, 2019).

Após a interação com o receptor e, consequente, ativação da cascata de segundos mensageiros, os endocanabinoides são direcionados para as vias de degradação. A principal enzima envolvida no processo de degradação da AEA é a hidrolase amida de ácido graxo (FAAH – do inglês *fatty acid amide hydrolase*), a qual gera como subproduto o ácido araquidônico e a etanolamina (KUMAR *et al.*, 2019). Em relação ao processo de degradação do 2-AG, a principal enzima que catalisa a hidrólise desse composto é a monoacilglicerol lipase (MAGL), gerando o ácido araquidônico e o glicerol (ZOU; KUMAR, 2018).

2.2.2 Receptores canabinoides

Os receptores CB1 e CB2 pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e possuem 44% de similaridade na constituição de aminoácidos (YE *et al.*, 2019). Com o avanço das tecnologias de microscopia, foi possível refinar e identificar a distribuição desses receptores no organismo, bem como identificar os principais mecanismos pelos quais esses induzem as respostas fisiológicas e farmacológicas no organismo (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020). Os receptores CB1 possuem considerável expressão na membrana pré-sináptica de neurônios excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA) sendo observada ação retrógrada e, possivelmente, relacionada à plasticidade sináptica atribuída a esses receptores (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020). A Figura 9 descreve a sinalização retrógrada do sistema endocanabinoide, incluindo as vias de biossíntese da AEA e do 2-AG, bem como as vias de degradação e o efeito neuromodulador gerado pela ativação dos receptores canabinoides. O receptor CB1, acoplado à proteína $G_{i/o}$, quando ativado inibe a enzima adenilato ciclase, diminuindo a concentração de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP – do inglês *cyclic adenosine monophosphate*). Consequentemente, ocorre a modulação dos canais de Na^+ e K^+ voltagem-dependentes com a diminuição dos neurotransmissores na fenda sináptica. Importante ressaltar que alguns estudos descrevem os receptores CB1 acoplados a proteína G_s e G_q (IANNOTTI; DI MARZO; PETROSINO, 2016).

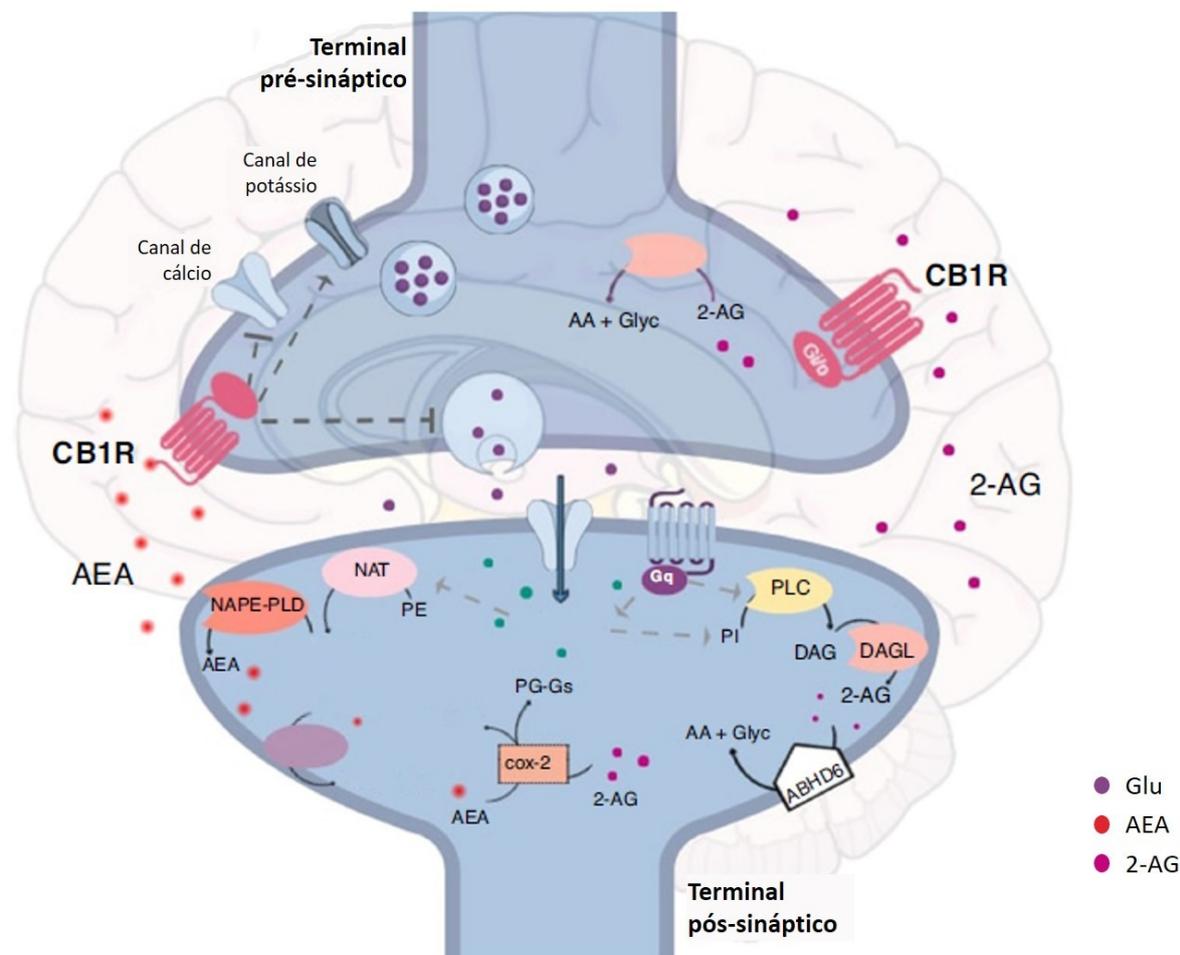


Figura 9. Atividade neuromoduladora do receptor canabinoide tipo 1 (CB1). O estímulo inicial para a síntese de endocanabinoides (AEA e 2-AG) pode ser originado da liberação de glutamato (Glu) na fenda sináptica e consequente estimulação dos receptores AMPA e mGLUR expressos nas membranas pré-sináptica e pós-sináptica dos neurônios. Os canabinoides endógenos no terminal pós-sináptico são mobilizados e, devido à sua natureza lipídica, são capazes de atravessar a membrana plasmática e interagir com receptores CB1 dos neurônios pré-sinápticos. Receptores CB1 comumente estão acoplados à proteína $G_{i/o}$, a qual é capaz de inibir os canais de cálcio voltagem dependentes diminuindo o influxo desse íon, alterar a atividade da enzima adenilato ciclase (AC) e, conseqüentemente, alterar a concentração de cAMP, da atividade da proteína quinase A (PKA) e ativação da ERK1/2, inibindo a liberação de neurotransmissores. Os endocanabinoides exercem função retrógrada, de forma a controlar a liberação dos neurotransmissores, manter a homeostase e prevenir a estimulação exacerbada dos neurônios. Sintetizados sob demanda, os endocanabinoides AEA e 2-AG após interação com os receptores, estarão disponíveis para recaptação pelos transportadores de membrana específicos. No meio intracelular essas moléculas serão substratos para as enzimas de degradação FAAH, MAGL, ABHD6 e COX-2 e consequente inativação das mesmas. 2-AG, 2-araquidonoilglicerol; AA, ácido araquidônico; ABHD6, α/β hidrolase domínio 6; AEA, N-araquidonoil-etanolamina; CB1R, receptor canabinoide tipo 1; COX-2, ciclooxigenase-2; DAG, diacilglicerol; DAGL, diacilglicerol lipase; FAAH, hidrolase amida de ácido graxo; Glyc, glicerol; MAGL, monoacilglicerol lipase; NArPE, N-araquidonoil fosfatidiletanolamina; NAPE-PLD, N-araquidonoil fosfatidiletanolamina fosfolipase D; PG-Gs, prostaglandinas; PI, fosfatidil inositol. Fonte: GONÇALVES e DUTRA, 2019.

No SNC, os receptores CB1 estão presentes em maior densidade no córtex pré-frontal, gânglios da base, hipocampo e cerebelo; e em quantidade moderada à baixa na substância cinzenta periaquedutal, amígdala, núcleo *accumbens* e tálamo; além de serem encontrados em células não neuronais, tais como oligodendrócitos, astrócitos e micróglia (MICALE;

DRAGO, 2018). Em contrapartida, os receptores CB2 são, predominantemente, expressos nas células do sistema imunológico, tal como linfócitos B, bem como nos órgãos periféricos, incluindo glândula adrenal, miocárdio, pulmão, endotélio e próstata, muito embora também sejam expressos em estruturas do SNC (TOCZEK; MALINOWSKA, 2018). Em revisão da literatura conduzida por Howlett e Abood (2017) foram reunidos estudos que destacam a expressão aumentada dos receptores CB2 em células ativas do sistema imunológico e, principalmente, durante o processo inflamatório. Além disso, também foi identificado a presença dos receptores CB2 nas células gliais, e em populações de neurônios do tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral de roedores (GONG *et al.*, 2006; VAN SICKLE *et al.*, 2005). Similarmente, dados imunohistoquímicos oriundos de estudos *post mortem*, indicam a expressão de receptores CB2 em áreas do encéfalo, que incluem o cerebelo, hipocampo, área tegumentar ventral, núcleo acumbens e o troco-encefálico (JORDAN; XI, 2019). A Figura 10 destaca as principais particularidades e funcionalidades dos dois receptores canabinoides.

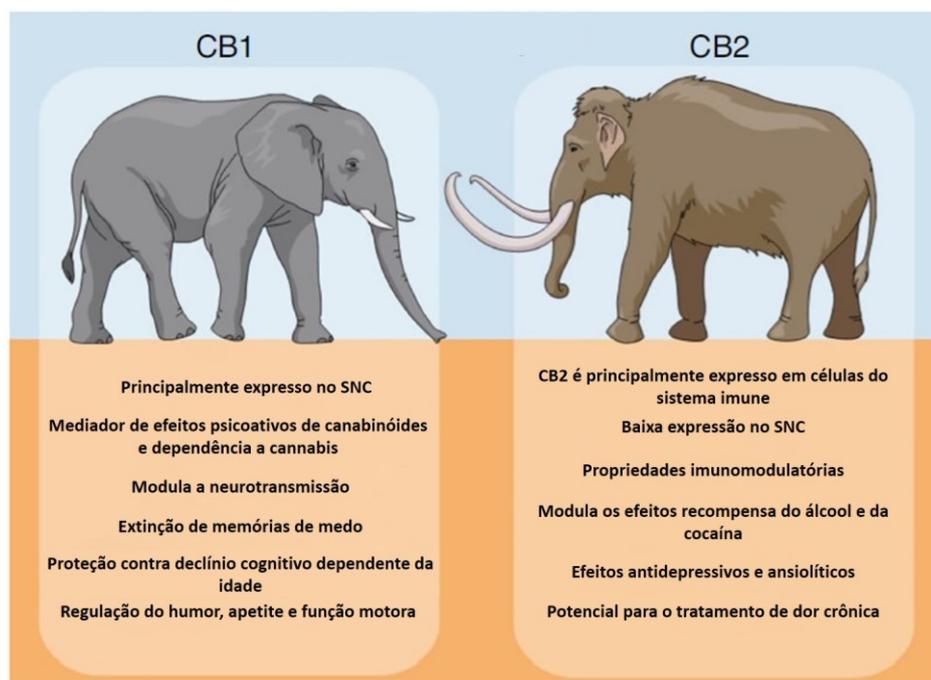


Figura 10. Representação esquemática das principais particularidades e mecanismos fisiológicos dos receptores canabinoides tipo 1 (CB1) e canabinoides tipo 2 (CB2), destacando os potenciais alvos terapêuticos no sistema endocanabinoide. SNC, sistema nervoso central. Fonte: GONÇALVES e DUTRA, 2019.

2.2.2.1 Receptor PPAR- γ : via não clássica de ação dos endocanabinoides

Os receptores PPAR- γ são fatores de transcrição nucleares ativados por ligantes que formam heterodímeros com receptores de ácido retinóico X. Por meio da translocação ao núcleo e consequente ligação em regiões específicas do DNA, o PPAR- γ é capaz de regular a

transcrição de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos e glicose, processos inflamatórios e diferenciação celular (COLLE *et al.*, 2016). Existem diversas moléculas capazes de interagir com esses receptores, sendo elas de origem endógena como ácidos graxos insaturados (ácido linoleico, linolênico e araquidônico) e eicosanoides; bem como aqueles de origem sintética de uso clínico, exemplificado pelas classes de medicamentos fibratos (usado em terapia associada a transtornos do colesterol) e glitazonas (utilizado na terapia do diabetes) (O'SULLIVAN, 2016). No âmbito referente à distribuição no SNC, pode-se destacar regiões ricas em receptores PPAR- γ , tais como córtex piriforme, gânglios da base, formação reticular, tálamo e hipocampo, bem como em neurônios dopaminérgicos, astrócitos e em subtipos celulares do sistema imunológico como macrófagos, células dendríticas e micróglia (PRASHANTHA KUMAR *et al.*, 2020; VILLAPOL, 2018).

Portanto, devido à íntima relação entre a homeostase do SNC e esses receptores, essa combinação se torna importante campo de estudo para o desenvolvimento de terapias relacionadas a doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, incluindo o TDM. No estudo controlado placebo duplo-cego realizado por Sepanjnia e colaboradores (2012), em pacientes diagnosticados com TDM, porém sem transtornos metabólicos, foi verificado que a terapia adjunta com pioglitazona (agonista PPAR- γ , 30 mg/dia) os parâmetros quanto à frequência de melhora inicial, resposta (durante seis semanas) e remissão do TDM foram melhores quando comparados ao grupo placebo. Estudos pré-clínicos também sustentam essa evidência (LIAO *et al.*, 2017; QIN *et al.*, 2020; ZONG *et al.*, 2018). Zhao e colaboradores (2016) verificaram o efeito da administração de pioglitazona (2,5 mg/kg/dia, durante 21 dias) em modelo de depressão induzido por estresse crônico leve em camundongos C57Bl/6. De acordo com os autores, o agonista PPAR- γ melhorou o comportamento tipo-depressivo (teste de suspensão pela cauda (TSC), teste do nado forçado (NF) e *splash test* (ST) dos animais submetidos ao estresse crônico, bem como reduziu a expressão de marcadores morfológicos pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF, iNOS – do inglês *inducible nitric oxide synthase* – e CCL-2) da micróglia no hipocampo e restaurou a expressão de marcadores pró-resolução (Ym1, Arg1, IL-4, IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*)). Sadaghiani e colaboradores (2011) também observaram redução significativa no tempo de imobilidade no NF em camundongos que receberam administração de pioglitazona (20 e 30 mg/kg). Adicionado aos aspectos supracitados, a ativação dos receptores PPAR- γ também representa potencial terapêutico para outras patologias neuropsiquiátricas (JUNG *et al.*, 2020), a se destacar a dependência de drogas (DE GUGLIELMO *et al.*, 2017; SCHMITZ *et al.*, 2017) e ansiedade (DOMI *et al.*, 2016).

Interessantemente, evidências científicas presentes na literatura destacam a ativação dos receptores PPAR- γ por ligantes endocanabinoides, canabinoides sintéticos e fitocanabinoides, fato que contribuiu para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e para o entendimento da fisiopatologia de diferentes condições de saúde (O'SULLIVAN, 2016). Nesse sentido, García-Martín e colaboradores (2019) observaram melhora nos biomarcadores referente à angiogênese e vasculogênese em modelo animal de esclerose sistêmica, por meio da administração de VCE-004.8, agonista canabinoide com ação via PPAR- γ /CB2R. Fakhfour e colaboradores (2012), também evidenciaram a ação do WIN55212-2 (agonista não seletivo CB1R e CB2R) via PPAR- γ na redução da sinalização inflamatória e na cascata de morte celular no hipocampo de ratos em modelo de neuroinflamação induzido por administração intrahipocampal de proteína beta-amilóide. Em adição, também é evidenciado o efeito do canabidiol via ativação do PPAR- γ na ubiquitinação da proteína precursora amiloide em modelo *in vitro* de cultura celular de neurônios SHSY5Y^{APP+}, com consequente redução da síntese de proteína beta-amilóide e na apoptose celular (SCUDERI; STEARDO; ESPOSITO, 2014). Portanto, esses achados da literatura destacam a interação entre elementos do sistema canabinoide e ativação dos receptores PPAR- γ , tornando-se uma alternativa promissora no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento de patologias neuropsiquiátricas, bem como permite o estabelecimento de novas vias mecânicas de ação durante o processo de busca por novas entidades farmacologicamente ativas.

2.2.3 Sistema endocanabinoide e TDM

O sistema endocanabinoide exerce funções pró-homeostáticas e, comumente, é ativado sob demanda em condições fisiológicas que incluem cognição, emoção e motivação (MICALE *et al.*, 2015). Em revisão da literatura realizada por Ibarra-Lecue e colaboradores (2018) são descritos diferentes estudos os quais evidenciam alterações nos componentes desse sistema no cérebro de pacientes com depressão e transtornos relacionados à ansiedade. Dentre essas alterações, pode-se destacar o aumento da densidade da expressão do RNA mensageiro e da funcionalidade de receptores CB1 no córtex pré-frontal dorsolateral; além da diminuição da concentração sérica dos endocanabinoides AEA e 2-AG e do polimorfismo genético relacionado à enzima FAAH com consequente redução na expressão celular (IBARRA-LECUE *et al.*, 2018).

Além dos aspectos supracitados, o sistema endocanabinoide está diretamente relacionado a regiões cerebrais responsáveis pela liberação de neurotransmissores

monoaminérgicos. Nesse aspecto, dados prévios demonstraram a expressão dos receptores CB1 e da enzima de degradação FAAH no núcleo dorsal da rafe – importante região de produção de 5-HT (EGERTOVÁ; CRAVATT; ELPHICK, 2003; HÄRING *et al.*, 2007). Ainda, nos neurônios noradrenérgicos, particularmente expressos no córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala, foi observada a expressão dos receptores CB1, incluindo nos axônios e terminais axonais dessa subpopulação de neurônios (HÄRING *et al.*, 2007; KATZMAN; FURTADO; ANAND, 2016). Por fim, a modulação da liberação de dopamina no córtex pré-frontal e núcleo *accumbens*, via administração do THC ou agonistas sintéticos do receptor CB1, também já foram descritos na literatura (CHEER *et al.*, 2004; PISTIS *et al.*, 2002).

Dessa forma, com a descoberta dos principais componentes do sistema endocanabinoide foi possível desenvolver diferentes ferramentas farmacológicas, as quais permitem verificar a influência desse sistema no organismo. Essas podem ser capazes de interferir na resposta dos receptores (CB1 e CB2), na síntese dos ligantes endógenos (AEA e 2-AG) ou ainda nas principais enzimas de degradação (FAAH e MAGL) de forma a evidenciar possíveis efeitos terapêuticos nas mais variadas patologias neurológica e neuropsiquiátrica (MICALE *et al.*, 2015).

Nesta perspectiva, Vieira e colaboradores (2020), através da utilização dos antagonistas CB1R (AM281) e dos CB2R (AM630), avaliaram a influência desses receptores canabinoides no mecanismo de ação do terpineol no modelo inflamatório de depressão induzido por LPS. Gáll e colaboradores (2020) avaliaram o efeito da administração crônica de canabidiol (modulador alostérico negativo do receptor CB1, agonista inverso do receptor CB2 e inibidor da enzima FAAH), no modelo de depressão por estresse crônico leve imprevisível. Dong e colaboradores (2020) evidenciaram o efeito tipo-antidepressivo do inibidor das enzimas FAAH e MAGL (JZL195) através de diferentes protocolos comportamentais (incluindo, teste de preferência por sacarose, interação social e nado forçado). Ante ao exposto, a modulação do sistema endocanabinoide pode e deve ser utilizada como ferramenta para a melhor compreensão da fisiopatologia de diferentes doenças neurológicas, neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, incluindo o TDM, bem como avança no paradigma científico na busca de novos alvos terapêuticos de interesse clínico (BURSTEIN *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2019; NAVARRETE *et al.*, 2020; ORSOLINI *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2020).

2.3 ÁCIDO ROSMARÍNICO

O ácido rosmarínico (*α-o-caffeoyl-3, 4-dihydroxyphenyl lactic acid*; AR), polifenol derivado do ácido cafeico e do ácido 3,4-dihidroxifenil láctico (Figura 11), foi inicialmente

identificado na espécie vegetal *Rosmarinus officinalis* L. (popularmente conhecida como alecrim) por pesquisadores italianos em 1958 (ALAGAWANY *et al.*, 2017). Essa molécula é encontrada em aproximadamente 30 famílias e mais de 50 espécies vegetais, com destaque para as famílias Boraginaceae e Lamiaceae, exemplificada por espécies como *Mentha* spp., *Melissa officinalis*, *Perilla frutescens*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris* (FACHEL *et al.*, 2019).

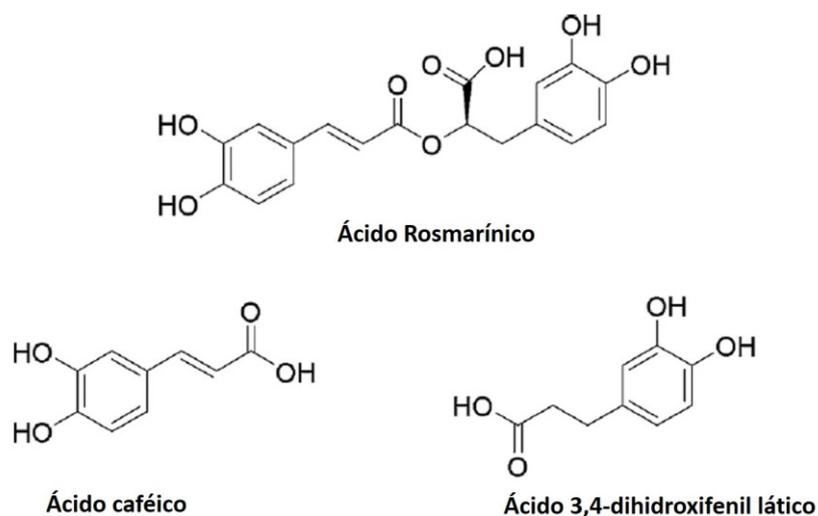


Figura 11. Estrutura química do ácido rosmarínico e seus precursores. Fonte: Adaptado de ELUFIOYE e HABTEMARIAM, 2019.

Em espécies vegetais, o AR é considerado metabólito secundário pertencente ao sistema de defesa da planta. Quando isolado, essa molécula está relacionada a diferentes atividades biológicas, as quais podem ser destacadas anti-inflamatória (JIANG *et al.*, 2018), antioxidante (LUFT *et al.*, 2019), neuroprotetora (CUI *et al.*, 2018; KHAMSE *et al.*, 2020) e antitumoral (HAN *et al.*, 2019; MESSEHA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019). Os mecanismos pelos quais o AR desenvolve suas ações farmacológicas foram razoavelmente explorados na literatura. Zhang e colaboradores (2017), ao avaliarem os efeitos neuroprotetores do AR no modelo animal de lesão cerebral induzida por isquemia e reperfusão, observaram a melhora no comportamento tipo-ansioso e na habilidade cognitiva dos animais e, que esses resultados poderiam estar associados à inibição da apoptose de neurônios hipocâmpais da área CA1 através da modulação da via Akt/C-jun N-terminal cinase (JNK3)/caspase-3. Lv e colaboradores (2019) observaram o efeito anti-inflamatório e ativação da micróglia após a administração do AR, no modelo de doença de Parkinson (DP) induzido por MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine*), assim como em cultura de micróglia da linhagem BV-2, respectivamente. Nesse estudo os autores demonstraram que, através da redução da

liberação de citocinas pró-inflamatórias e da diminuição da ativação microglial, o AR bloqueou a neurodegeneração em camundongos que desenvolveram a DP, e que esse efeito poderia estar associado à via de sinalização mediada pelo *high mobility group box 1* (HMGB1)/TLR4/NF- κ B. Ainda, Ma e colaboradores (2020) avaliaram os efeitos neuroprotetores do AR em modelos *in vitro* e *in vivo* de lesão do cordão espinhal, através da inibição do dano oxidativo, inflamação, ativação da via caspase-3 e apoptose celular, e ainda modulação dos fatores de transcrição do fator nuclear derivado de eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) e NF- κ B, respectivamente. Portanto, o completo entendimento dos mecanismos relacionados aos efeitos do AR torna-se fundamental para possível aplicação terapêutica desse em diferentes processos fisiopatológicos, incluindo os distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos.

2.3.1 Ácido rosmarínico e depressão

Alguns estudos já demonstraram a atividade antidepressiva do AR, particularmente, relacionada à suas atividades anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora. Nesta perspectiva, Takeda e colaboradores (2002) observaram a redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos ICR, nos quais foram administrados AR (1 a 4 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)), porém esse efeito não está relacionado à recaptção de monoaminas tampouco com a atividade da MAO. Ainda, Lin e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da administração aguda de AR (36 mg/kg, via oral) em ratos *Sprague-Dawley*, e observaram redução no comportamento tipo-depressivo nos animais tratados, porém os autores não observaram correlação desse efeito com os níveis dos neurotransmissores. Sasaki e colaboradores (2013), através de estudos *in vitro* com células PC12, observaram efeito positivo na regulação dos genes que codificam as enzimas tirosina hidroxilase e piruvato carboxilase, diretamente relacionadas às vias de regulação da dopamina, 5-HT e GABA após o tratamento com AR.

Ainda referente aos possíveis efeitos antidepressivos do AR, Ito e colaboradores (2008) investigaram a influência da administração de AR (1, 2, e 4 mg/kg, i.p.) em camundongos ddY, durante 7 e 14 dias na neurogênese hipocampal através da técnica de imunohistoquímica com o indicador de proliferação celular (*bromodeoxyuridine*). Os resultados desse estudo indicaram o aumento significativo da quantidade de células no giro denteado do hipocampo, bem como o tratamento com AR promoveu diminuição no tempo de imobilidade no teste de nado forçado sem comprometimento locomotor dos animais. Jin e colaboradores (2013) avaliaram o efeito antidepressivo do AR em modelo pré-clínico de

estresse crônico imprevisível em ratos *Sprague-Dawley*. Nesse estudo foi observado aumento da expressão de BDNF por astrócitos no hipocampo, o qual poderia estar relacionado à via de modulação de fosforilação da proteína *extracellular-regulated kinase* (ERK). Ante aos aspectos expostos, estudos adicionais que visam investigar a influência do AR na patofisiologia da depressão são necessários, de forma a elucidar distintos mecanismos pelos quais essa molécula promove efeito tipo antidepressivo (GHASEMZADEH RAHBARDAR; HOSSEINZADEH, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

O TDM é uma patologia de origem multifatorial, que acomete cerca de 280 milhões de indivíduos em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021), a qual foi considerada a terceira grande causa de despesas relacionadas à doenças em levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2008, com projeções de ocupar a primeira posição até 2030 (MALHI; MANN, 2018). Os sintomas associados geram prejuízos funcionais e dificuldade de relacionamentos interpessoais, acarretando sofrimento psicológico, redução da produtividade no trabalho e da qualidade vida, bem como está intimamente relacionado ao suicídio. Atrelado a esses fatores está o aumento das despesas econômicas aos países, para o tratamento e reinserção desses indivíduos ao mercado de trabalho (HALARIS; SOHL; WHITHAM, 2021).

No âmbito do esquema terapêutico do TDM, uma das principais intervenções clínicas é a farmacoterapia. No entanto, os fármacos atualmente disponíveis no mercado estão associados à vários efeitos adversos, incluindo insônia, fadiga, alterações sexuais e ganho de peso, os quais contribuem para não aderência dia indivíduo ao tratamento (GONDA *et al.*, 2021). Em adição, é observada uma resposta limitada ou ausente aos medicamentos antidepressivos em uma parcela de indivíduos diagnosticados com depressão, o que caracteriza o tratamento resistente (HOWES; THASE; PILLINGER, 2021). Diante dos aspectos supracitados, a descoberta de novas moléculas com ação tipo-antidepressiva que estejam associadas a uma resposta terapêutica mais rápida, maior eficácia, tolerabilidade e efetividade a longo prazo, bem como a mecanismos distintos ao sistema monoaminérgico, se tornam um campo promissor na pesquisa científica (GONDA *et al.*, 2021). Dessa forma, os componentes do sistema endocanabinoide se tornam um importante nicho de estudo, já que funções fisiológicas associadas ao TDM podem ser atribuídas à esse sistema, tais como cognição, emoção e motivação (MICALE *et al.*, 2015). Adicionalmente, alterações na densidade, expressão e funcionalidade dos receptores CB1R, bem como a redução sérica dos

canabinoides endógenos AEA e 2-AG, são evidenciados em indivíduos diagnosticados com TDM (IBARRA-LECUE *et al.*, 2018). Moléculas exógenas também são capazes de interagir e modular o sistema endocanabinoide, como aquelas oriundas de espécies vegetais (BAHI *et al.*, 2014; HASSANZADEH; HASSANZADEH, 2012; KUMAR *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019), as quais se tornam alvos promissores no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, incluindo a depressão.

Assim, os dados acima destacados reforçam a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas antidepressivas, bem como evidencia a modulação dos componentes do sistema endocanabinoide como alvo molecular alternativo com ação antidepressiva. Nesse sentido, é proposto os receptores canabinoides e PPAR- γ como possíveis vias mecânicas de ação pela qual o AR exerce seu efeito tipo-antidepressivo, por meio da utilização de abordagens *in silico* e *in vivo*, em modelo pré-clínico de depressão induzido por LPS.

4 HIPÓTESE

O AR apresenta efeito tipo-antidepressivo através da modulação do sistema endocanabinoide e sinalização mediada pelo PPAR- γ , o qual representa importante alternativa terapêutica para o tratamento de transtornos neurológicos e neuropsiquiátricos.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

O desenvolvimento do presente estudo tem como objetivo investigar a influência do AR no comportamento tipo-antidepressivo no modelo experimental de depressão induzida por inflamação periférica, bem como investigar a participação dos receptores canabinoides e a sinalização mediada pelo PPAR- γ como vias de ação nesse contexto.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e toxicidade *in silico*, além da predição dos alvos moleculares associados ao AR;
- Avaliar as atividades antioxidante e inibitória da enzima acetilcolinesterase *in vitro* pelo AR;
- Avaliar o efeito tipo-antidepressivo do AR no modelo de depressão induzida por inflamação periférica;

- Investigar a participação dos receptores canabinoides no comportamento tipo-antidepressivo do AR;
- Investigar o envolvimento da sinalização mediada pelo PPAR- γ no comportamento tipo-antidepressivo do AR.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 ANÁLISES *IN SILICO*

6.1.1 Dados primários e forma canônica *SMILES*

Informações químicas e estruturais referente ao AR, incluindo a forma molecular canônica SMILES (do inglês – *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) - C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O, necessária para utilização das ferramentas online utilizadas nesse estudo foram obtidas na plataforma PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.1.2 Perfil ADMET

O perfil de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) foi estabelecido por meio da utilização de duas ferramentas online: i) *Swiss ADME* (<http://www.swissadme.ch/index.php#>) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; DE ASSIS *et al.*, 2020); e ii) servidor ADMET SAR (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetsar2/>) (CHENG *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2020b). As propriedades ADMET contribuem para a obtenção do perfil farmacocinético e são essenciais para determinar a atividade farmacodinâmica de compostos (NISHA *et al.*, 2016).

6.1.3 Predição de alvos moleculares

Para identificar os possíveis ligantes moleculares do AR, os quais podem estar relacionados aos efeitos farmacológicos evidenciados por essa molécula, foram utilizadas as seguintes plataformas online: i) *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) (DE ASSIS *et al.*, 2020); e ii) *PASS online* (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>) (GONÇALVES *et al.*, 2020b; POROIKOV *et al.*, 2019). Essas ferramentas relacionam possíveis alvos de interação de moléculas com o organismo humano e de outros vertebrados, sendo que a pesquisa realizada nesse trabalho foi limitada à espécie “*Homo sapiens*”.

6.2 PROTOCOLOS *IN VITRO*

6.2.1 Atividade antioxidante

A metodologia utilizada para avaliação da atividade antioxidante foi descrita por Sreejayan e Rao (1996), com modificações, através do método de sequestro de espécies reativas de oxigênio evidenciado pela redução do *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH, 0,05 mM). Inicialmente foi preparada solução de AR (1000 µg/mL) solubilizada em etanol (P.A.). A partir dessa, diluições seriadas foram realizadas, sendo o etanol absoluto o diluente. As concentrações-teste foram avaliadas na faixa de 0,97 a 250 µg/mL obtida através do preparo de uma microplaca de 96 poços, nos quais foram adicionados 150 µL de DPPH e 50 µL das soluções seriadas preparadas previamente. Para evitar possível interferência da coloração da amostra, foi preparado o branco da amostra para cada concentração por meio da adição de 150 µL de etanol em 50 µL da solução teste. O padrão utilizado neste protocolo experimental foi o resveratrol (Fragon, Brasil) igualmente preparado à amostra e na mesma faixa de concentração. Ao término do preparo da placa, essa foi alocada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro (Multiskan GO, Datamed, Brasil) no comprimento de onda fixo de 510 nm. A atividade antioxidante foi obtida por meio da equação: inibição (%) = $100 \times (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / A_{\text{DPPH}}$, na qual A_{amostra} é o valor da absorbância da solução contendo a amostra mais o DPPH; A_{branco} equivale ao valor da absorbância da solução contendo amostra mais o etanol; e A_{DPPH} equivale à solução etanólica de DPPH. Ao final do processo foram obtidas as absorbâncias para cada concentração e as porcentagens de atividade antioxidante foram devidamente calculadas. De posse do dado foi possível elaborar o gráfico dose-resposta, e calcular a concentração que inibiu 50% das espécies reativas de oxigênio presente no DPPH (CI_{50}), por meio da equação da reta.

6.2.2 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A atividade inibitória da enzima AChE foi avaliada pelo método colorimétrico de Ellman modificado (DE ASSIS *et al.*, 2020; ELLMAN *et al.*, 1961). Inicialmente foi preparado o tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0). Em uma placa de 96 poços foram adicionadas as seguintes soluções: 25 µL de iodeto de acetilcolina (AChI, 15 mM), 125 µL de 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (3 mM), 50 µL do tampão previamente preparado e 25 µL de AR dissolvido em metanol na faixa de concentração de 62,5 a 1000 µg/mL. Em seguida, 25 µL de uma solução de AChE (0,22 U/mL) e a absorbância foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm durante 41 ciclos de 15 segundo em

temperatura de 37 °C. Objetivando evitar resultados falsos positivos, teste paralelo com DTNB foi realizado. Nesse protocolo, o fármaco eserina foi utilizado como controle positivo, e todas as amostras foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com equação: inibição (%) = [(E-S)/S] x 100, onde E representa a atividade da enzima sem o AR e S representa a atividade da enzima com o AR. A partir da obtenção da porcentagem de inibição foi possível calcular a concentração que inibiu 50% da hidrólise da acetilcolina, determinada pela análise da regressão não-linear usando o software Graph Pad Prism (versão 8.2.1).

6.3 MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR LPS

6.3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* machos (8 – 12 semanas de idade, peso aproximado de 35 – 45 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). A alocação, bem como todo o protocolo experimental, foi realizada no Biotério Setorial da UFSC, Campus Araranguá. Os animais foram alocados em gaiolas coletivas de plástico, sob condições ambientais pré-estabelecidas com ambiente climatizado, com temperatura ajustada para $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro 12 horas. A água e ração específica para roedores foram oferecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA/UFSC – CEUA nº 3914220319). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos foram os mínimos necessários para realizar os protocolos *in vivo*. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normatizações da CEUA/UFSC, bem como atenderam na totalidade os princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento) e guia *ARRIVE* (DU SERT *et al.*, 2020), além das diretrizes de manejo e cuidados de animais para fins científicos internacional (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*). Os animais foram aclimatizados por no mínimo 1 hora antes do início dos testes comportamentais.

6.3.2 Modelo experimental – depressão induzida por LPS

O modelo de indução da depressão foi realizado através da administração periférica de LPS na dose de 0,5 mg/kg, via intraperitoneal (i.p.), solubilizado em salina estéril 0,9% e isenta de endotoxina. A dose selecionada está de acordo com estudos prévios, a qual é considerada a concentração segura para a não indução de sepse (HUANG *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2020; YAO *et al.*, 2016). Inicialmente foi avaliado o efeito *per se* do AR, no qual foram preparadas concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/kg solubilizadas em 5% de

dimetilsulfóxido (DMSO) em água deionizada. As doses selecionadas, bem como a via de administração, estão de acordo com estudos prévios na literatura (JANG *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2009; SOTNIKOVA *et al.*, 2013). As soluções-teste ou veículo foram administradas por gavagem (via oral - v.o.) 1 hora antes dos testes comportamentais – teste de suspensão pela cauda (TSC) e *splash test* (ST). A imipramina na dose de 20 mg/kg, solubilizada em água deionizada administrada via intraperitoneal (i.p.), foi utilizada como controle positivo do protocolo (VIEIRA *et al.*, 2020). A partir da avaliação inicial, a dose de 50 mg/kg de AR foi selecionada para as demais abordagens experimentais. Com o objetivo de investigar o efeito tipo-antidepressivo do AR, distintos protocolos experimentais foram estabelecidos (Figura 12). Primeiramente, o AR (50 mg/kg, v.o.) foi administrado 1 hora (tratamento agudo preventivo – Figura 12A) ou diariamente durante 7 dias (tratamento repetido preventivo – Figura 12B) antes do estímulo com LPS. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: i) *naive*; ii) LPS (0,5 mg/kg, i.p.); iii) AR (50 mg/kg, v.o.) + LPS; iv) Imipramina (20 mg/kg, i.p.) + LPS. Para evitar a interferência do comportamento tipo-doente, comumente observado em camundongos expostos ao LPS, as análises comportamentais foram realizadas 24 horas após a administração do LPS. Posterior a esse período, os animais foram submetidos a diferentes protocolos comportamentais, incluindo TSC, ST e teste do campo aberto (TCA). Em relação à abordagem terapêutica, uma única dose de AR (50 mg/kg) foi administrada nos animais 23 horas após à injeção com LPS (Figura 12C), e os testes comportamentais realizados 24 horas posterior ao estímulo. De acordo com os objetivos previamente estabelecidos, o envolvimento dos receptores canabinoides foi investigado como possível mecanismo de ação pelo qual o AR induz o efeito tipo-antidepressivo. Dessa forma, os animais foram previamente tratados com antagonistas CB1R (AM281 – 1 mg/kg, i.p.) e CB2R (AM630 – 1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do AR (50 mg/kg, v.o.). Adicionalmente, o envolvimento do receptor PPAR- γ também foi avaliado por meio do pré-tratamento com antagonista seletivo PPAR- γ (GW9662 – 1 mg/kg, i.p.). Os três antagonistas foram solubilizados em 5% DMSO, 1% etanol P.A. em água deionizada, e as doses selecionadas estão de acordo com estudos prévios (BENTO *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2020). Nesse protocolo os animais foram divididos em: i) LPS, o qual recebeu apenas a dose de LPS (0,5 mg/kg – i.p.); ii) AR (50 mg/kg, v.o.) + LPS; iii) AM281 (1 mg/kg, i.p.) + AR + LPS; iv) AM630 (1 mg/kg, i.p.) + AR + LPS; e v) GW9662 (1 mg/kg, i.p.) + AR + LPS. Os protocolos com os antagonistas estão descritos na Figura 12D.

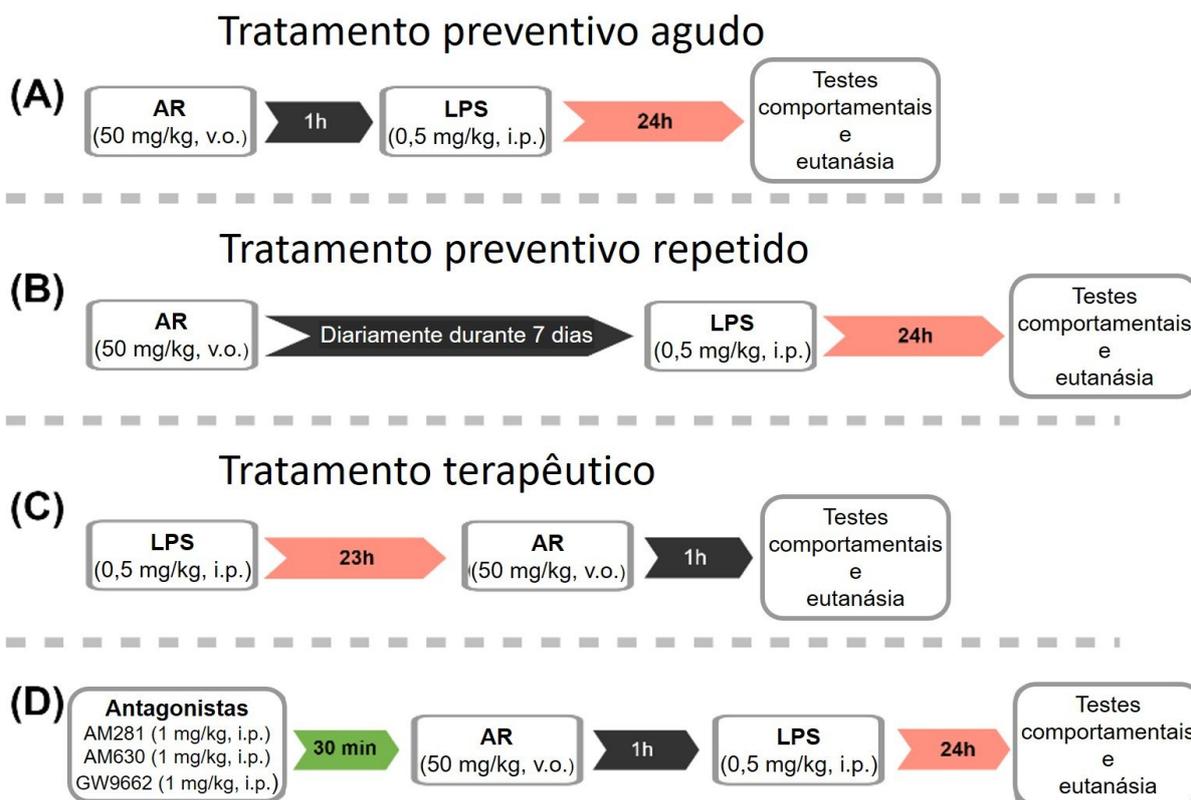


Figura 12. Delineamento experimental da avaliação do efeito tipo-antidepressivo do AR no modelo experimental de depressão induzida por LPS. Protocolo preventivo agudo com a definição temporal de administração de AR (50 mg/kg, v.o.), imipramina (20 mg/kg, i.p.) e LPS (0,5 mg/kg, i.p.) (A). Protocolo preventivo repetido com administração das doses do AR, 1x/dia, por um período de 7 dias prévios a indução, sendo a última dose administrada 60 minutos antes do LPS (B). Protocolo terapêutico realizado através da administração de AR 23 horas posterior à injeção de LPS (C). Investigação da participação dos receptores canabinoides e PPAR- γ no efeito tipo-antidepressivo do AR, por meio da administração de AM281 (1 mg/kg, i.p.) e AM630 (1 mg/kg, i.p.), antagonistas dos receptores CB1 e CB2, respectivamente e GW9662 (1 mg/kg, i.p.) (D). Após 24 horas da sensibilização com LPS (tempo 0), os animais foram submetidos aos testes comportamentais e, em seguida, foi realizada a eutanásia. Foi estabelecido o número de 5-10 animais por grupo em todos os protocolos descritos. AR, ácido rosmarínico; i.p., intraperitoneal; LPS, lipopolissacarídeo; ST, *splash* teste; TSC, teste de suspensão pela cauda; v.o., via oral.

6.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

6.4.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda 24 horas após imunização com LPS para avaliação do comportamento tipo-depressivo (MACHADO et al., 2012a). Os animais foram suspensos a 50 cm da superfície com auxílio de fita adesiva presa aproximadamente a 1 cm da ponta da cauda, pelo período de 6 minutos. Os parâmetros analisados foram: o tempo total de imobilidade; o tempo de latência (tempo gasto no qual o animal leva para ficar imóvel pela primeira vez), e o número de vezes que o animal fica imóvel.

6.4.2 Teste de *splash* (ST)

O teste de *splash* foi usado para a observação do comportamento anedônico, descrito por Moretti e colaboradores (2015). Para realização desse teste, 200 µL de solução de sacarose a 10% foram borrifados no dorso do animal, alocado em aparato cilíndrico de acrílico, com o objetivo de evitar qualquer interação com meio externo. Imediatamente após, o tempo gasto na autolimpeza foi avaliado pelo período de 5 minutos (tempo de *grooming*), a latência para iniciar o primeiro *grooming* e o número de *grooming* foram os parâmetros avaliados.

6.4.3 Teste do campo aberto (TCA)

A avaliação locomotora e exploratória dos animais foi realizada através do teste de campo aberto de acordo com Vieira e colaboradores (2020). Os animais foram colocados individualmente no centro de aparato de madeira (40 x 60 x 50 cm) com fundo subdividido em 12 quadrados de dimensões iguais. O parâmetro analisado foi a quantidade de vezes em que o animal atravessou completamente para outro quadrado, sendo considerado o ato de atravessar apenas quando o animal passou com as quatro patas para o outro quadrado, durante o período de 6 minutos. Ao término desse tempo, o aparato foi higienizado com solução de etanol 30%.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do *post hoc* teste de Bonferroni para comparações múltiplas ou teste T de *student* quando aplicado, utilizando o *software* GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média de 5-10 animais por grupo e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para avaliação da magnitude do efeito foi calculado o *d* de Cohen através da equação: diferença entre as médias do grupo LPS e AR dividido pelo desvio padrão agrupado dos mesmos (COHEN, 1988; FRITZ; AMREIN; WOLFER, 2017; LAKENS, 2013).

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO ADMET E ALVOS DE LIGAÇÃO DO AR

Inicialmente, através das análises *in silico* realizadas nesse trabalho, foi possível evidenciar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do AR. Dessa forma, o AR apresenta peso molecular = 360,31 g/mol e $\text{Log Po/w} = 1,52$, e assim obedece aos critérios da “Regra dos 5” (RO5) de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2012) e os filtros

de Ghose (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999) – Tabela 1 – indicando que o mesmo apresenta características mínimas relacionadas a problemas e/ou dificuldades nas etapas de absorção, dissolução e permeabilidade.

Tabela 1. Parâmetros da regra dos cinco de Lipinski e filtro de Ghose do AR obtido do servidor online *Swiss ADME*.

Fórmula molecular	C18H16O8
Peso molecular	360,31 g/mol
Log P	1,52
Doador de LH	5
Receptor de LH	8
Número de ligações giratórias	7
Refratividade molar	91,40

Análise obtida pela ferramenta online *Swiss ADME*. Disponível em: <http://www.swissadme.ch/index.ph>. AR: Ácido rosmarínico; LH: ligação de hidrogênio

Adicionado a esses dados, o perfil ADMET obtido nas plataformas online *Swiss ADME* e *ADMET-SAR*, encontra-se expresso na Tabela 2. Observa-se que o AR possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e as células Caco-2, evidenciando que essa molécula possivelmente apresenta a capacidade de exercer efeitos no SNC, bem como absorção intestinal, respectivamente. Interessantemente, o AR não está relacionado como potencial substrato para glicoproteína P (P-gp), considerada uma proteína de membrana envolvida no efluxo celular de xenobióticos (MOLLAZADEH *et al.*, 2018), bem como não é inibidora do complexo de enzimas P450, responsável pelo metabolismo de moléculas externas ao organismo (MANIKANDAN; NAGINI, 2017). O perfil toxicológico indica que o AR não apresenta potencial mutagênico e carcinogênico. Finalmente, os dados *in silico* demonstram a segurança do AR, visto que a dose letal em roedores foi de $DL_{50} = 2,3234$ mols/kg (equivalente a $8,37 \times 10^5$ mg/kg).

Tabela 2. Perfil *in silico* do AR nas etapas de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade obtido das plataformas online *Swiss ADME* e *ADMET-SAR*.

	Parâmetro	Resultado	Probabilidade
ABSORÇÃO / TOXICIDADE	Barreira hematoencefálica	+	0,6095
	Absorção intestinal humana	+	0,7243
	Caco-2	+	0,8957
	Teste AMES	Não tóxico	0,7412
	Carcinogenicidade	Não carcinogênico	0,9414
	Toxicidade aguda em ratos (DL50; mol/kg)	2,3234	-
DISTRIBUIÇÃO / METABOLISMO	P-gp	Não substrato	0,8750
	CYP-2C9	Não substrato	0,7660
	CYP-2D6	Não substrato	0,9035
	CYP-3A4	Não substrato	0,6114
	CYP-1A2	Não inibidor	0,6279
	CYP-2C19	Não inibidor	0,9026
	CYP promiscuidade inibitória	Baixa inibição	0,8300

Análises disponíveis em: <http://www.swissadme.ch/index.ph> e <http://lmmd.ecust.edu.cn/admet-sar/>. CYP: citocromo 450; DL: dose letal; p-gp: glicoproteína-P.

Acrescentado às análises *in silico*, o perfil dos principais e potenciais alvos moleculares relacionados às propriedades biológicas do AR estão descritos na Tabela 3. De acordo com as ferramentas online *Swiss Target Prediction* e *PASS online*, o AR apresentou potencialidade de interação com aproximadamente 50 proteínas e/ou alvos moleculares distintos, dentre as quais destacam-se: i) proteína tirosina cinase; ii) matrix metaloproteinase; iii) ciclo-oxigenase; iv) receptor ativado por proliferador de peroxissomos; v) acceptor de espécies reativas de oxigênio; vi) inibidor da expressão do TNF; e vii) inibidor da expressão da enzima janus kinase 2 (JAK2). Os receptores canabinoides CB1 e CB2 também foram descritos como possíveis alvos moleculares do AR, fato que insere o sistema endocanabinoide como um dos objetivos específicos deste projeto, e possível mecanismo de ação tipo-antidepressivo do AR.

Tabela 3. Potenciais alvos moleculares do AR obtido das plataformas online *Swiss Target Prediction* e *PASS online*.

<i>Swiss target prediction</i>	
Alvos	ChEMBL ID
Proteína tirosina cinase FYN	CHEMBL1841
Matrix metaloproteinases subtipos 1, 9, 2, 12, 13	CHEMBL332; CHEMBL321; CHEMBL333; CHEMBL4393; CHEMBL280; CHEMBL283
Receptor proteína tirosina cinase erbB-2	CHEMBL1824
Ciclo-oxigenase	CHEMBL221
Transportador de noraepinefrina	CHEMBL222
MAP cinase ERK2	CHEMBL4040
Aldo-ceto redutase família 1, membros C3, C4, C2, B10	CHEMBL4681; CHEMBL4999; CHEMBL5847; CHEMBL5983
Receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa	CHEMBL239
Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama	CHEMBL235
Receptor ativado por proliferador de peroxissomo delta	CHEMBL3979
Proteína beta-amiloide A4	CHEMBL2487
Receptor canabinoide tipo 1	CHEMBL218
Receptor canabinoide tipo 2	CHEMBL253
<i>PASS online</i>	
Atividade	Pa/Pi
Aceptor de espécies reativas de oxigênio	0.745/0.003
Inibidor da expressão de TNF	0.744/0.005
Inibidor da expressão de JAK2	0.745/0.013
Inibidor da expressão de metaloproteinase subtipo 9	0.730/0.005

Análises disponíveis em <http://www.swisstargetprediction.ch/> e <http://www.pharmaexpert.ru/passonline:>
JAK2: *Janus kinase 2*; TNF: *tumor necrosis factor*.

7.2 PROTOCOLOS *IN VITRO*

7.2.1 Avaliação do potencial antioxidante

Os resultados foram expressos em CI_{50} (Tabela 4), a qual estabelece que quanto menor os valores desse parâmetro maior é a capacidade antioxidante da molécula. O tratamento com AR induziu a atividade de sequestro de espécies reativas de oxigênio ($CI_{50} = 0,916 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$, $p < 0,0001$) quando comparado ao padrão de referência resveratrol ($CI_{50} = 8,45 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 4. Atividade antioxidante do AR e resveratrol.

Amostra	Atividade antioxidante ($CI_{50} = \mu\text{g/mL}$)
AR	$0,916 \pm 0,11$ ****.
Resveratrol	$8,45 \pm 0,44$

O sobrescrito (****) indica diferença significativa entre o AR e o resveratrol ($p < 0,0001$), através da análise estatística realizada por teste-t de Student (média \pm desvio padrão, $n = 3$). AR: ácido rosmarinico.

7.2.2 Efeito inibitório do AR na atividade da AChE

A Tabela 5 apresenta a atividade inibitória do AR e eserina, usada como controle positivo, na enzima AChE. Estudos prévios classificam essa atividade biológica conforme a porcentagem de inibição da enzima AChE, sendo considerados potentes aqueles com inibição $>50\%$, moderados com inibição de 30 a 50% e baixa/inativa com inibição $<30\%$ (AZMAN *et al.*, 2020; VINUTHA *et al.*, 2007). Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o AR apresentou potente atividade anti-colinesterase, com inibição de 58% e $CI_{50} = 1,614 \mu\text{g/mL}$, como atividade inibitória similar ao fármaco de referência ($CI_{50} = 2,0 \mu\text{L}$)

Tabela 5. Atividade inibitória da enzima AChE pelo AR.

Amostra	Inibição da AChE (%)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
AR	58	1,614
Eserina	100	2,0

7.3 PROTOCOLOS *IN VIVO*

7.3.1 Efeito do tratamento preventivo e terapêutico com AR no comportamento tipo-depressivo induzido pelo LPS

Inicialmente investigou-se o efeito *per se* do AR no comportamento tipo-depressivo dos animais. Conforme observado na Figura 13, o tratamento com AR (5 – 100 mg/kg, v.o.) inibiu significativamente o tempo de imobilidade no TSC ($p < 0,01$, Figura 13A) comparado ao grupo veículo, com inibição de 42%, 49%, 52% e 49% nas doses de 5, 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Não foi observada diferença significativa no número de imobilidade durante o TSC ($p > 0,05$, Figura 13B), bem como nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros de latência para *grooming* ($p > 0,05$, Figura 13C) e no tempo de *grooming* ($p > 0,05$, Figura 13D) durante o ST. Adicionalmente, foi calculada a concentração efetiva de 50% ($CE_{50} = 54,79$ mg/kg), a qual corresponde à dose necessária para ser evidenciado 50% da resposta biológica. Assim, a partir desse resultado, a dose de 50 mg/kg foi selecionada para os demais protocolos.

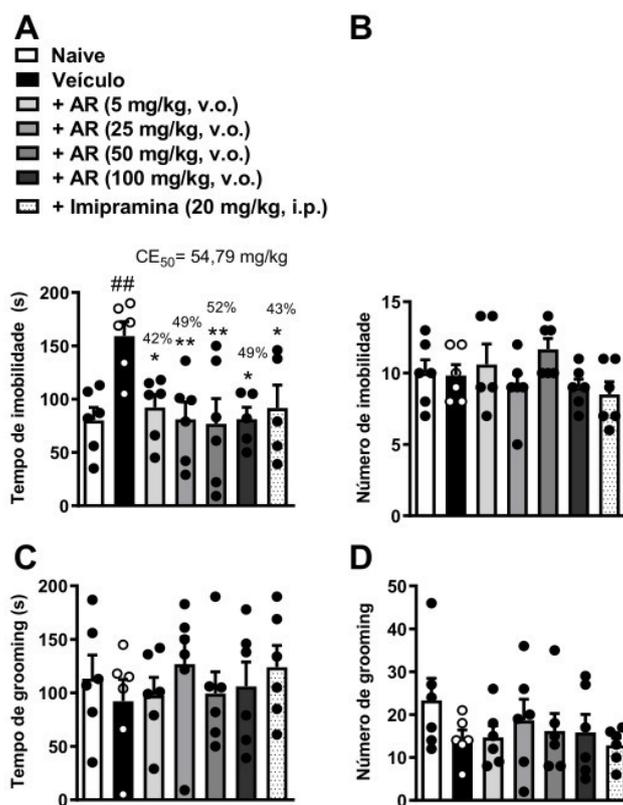


Figura 13. Efeito *per se* do tratamento com AR no comportamento tipo-depressivo dos animais. O tratamento com veículo (5% DMSO em água deionizada), AR (5, 25, 50 e 100 mg/kg – v.o.) e imipramina (20 mg/kg, i.p.) foram investigados no teste de suspensão pela cauda (A e B) e no *splash test* (C e D). Os dados foram expressos como média \pm EPM de 6 animais/grupo. ## $p < 0,01$ representa diferença significativa em relação ao grupo naive; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguido por teste *post-hoc* de Bonferroni).

Com o objetivo de investigar o efeito preventivo do AR no comportamento tipo-depressivo foi utilizado o modelo de depressão induzido pela administração única e sistêmica de LPS (0,5 mg/kg, i.p.). Os animais foram avaliados no protocolo agudo (Figura 14) e repetido (Figura 15), após a administração de AR (50 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes do estímulo periférico com LPS, ou 1x/dia durante 7 dias prévios ao algogênico, respectivamente. Conforme observado na Figura 14, a administração de LPS induziu aumento significativo do tempo de imobilidade ($p < 0,05$, Figura 14B), bem como reduziu o tempo de *grooming* ($p < 0,05$, Figura 14E) quando comparado ao grupo naive. Esse dado confirma que a administração periférica do LPS contribui para a resposta neuroinflamatória e, posterior, comportamento tipo-depressivo em roedores (ARAKI *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2020; YAO *et al.*, 2016). Relevantemente, observou-se redução significativa no tempo total de imobilidade dos animais tratados previamente com AR, bem como do controle positivo, comparado ao grupo LPS ($p < 0,01$, $d_{AR} = 1,985$, $d_{imipramina} = 1,331$, Figura 14B). No entanto, não foi possível observar diferença nos parâmetros de latência para imobilidade e no número total de imobilidade nesses animais (Figura 14A e C, respectivamente). Conforme ilustrado na Figura 14, o tratamento com AR na dose de 50 mg/kg (v.o.) reduziu significativamente o tempo de latência para os animais iniciarem o comportamento de *grooming* ($p < 0,01$, $d = 1,486$, Figura 14D), bem como aumentou o tempo total de *grooming* ($p < 0,05$, $d = 1,261$, Figura 14E) quando comparado ao grupo LPS. Por outro lado, nenhuma diferença estatística foi observada em relação ao número total de *grooming* (Figura 14F) entre os grupos experimentais. Além das avaliações supracitadas, foi ainda realizado o teste do campo aberto (Figura 14G e H). Através desse protocolo foi evidenciado que os tratamentos não induziram comprometimento motor nos animais, observado pela avaliação do número de quadrantes percorridos e número de levantamentos, indicando que os efeitos comportamentais evidenciados pelo tratamento com AR ocorreram independentemente de alterações motoras.

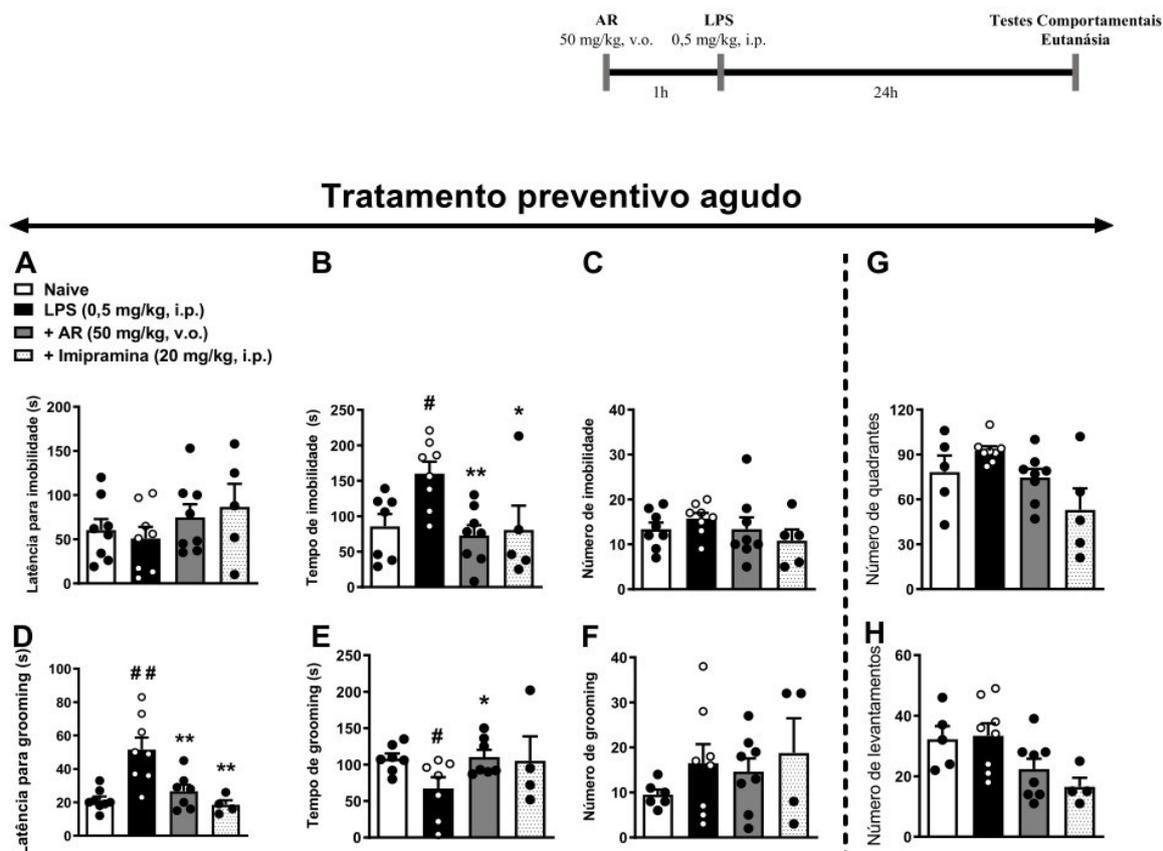


Figura 14. Efeito do tratamento preventivo e agudo com AR (50 mg/kg, v.o.) e imipramina (20 mg/kg, i.p.) no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. Os animais foram avaliados no teste de suspensão pela cauda (A-C), *splash test* (D-F) e no teste do campo aberto (G e H). Os dados foram expressos como média \pm EPM de 5-8 animais/grupo. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ apresenta diferença significativa comparada ao grupo naive; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo LPS (ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Bonferroni)

Ainda referente ao efeito preventivo do tratamento com AR no comportamento tipo-depressivo dos animais, novos grupos de animais foram devidamente tratados com AR (50 mg/kg, v.o.) diariamente durante sete dias previamente ao estímulo periférico com LPS. Conforme ilustrado na Figura 15, o tratamento repetido com AR reverteu de maneira significativa a gênese do comportamento tipo-depressivo nos animais. Nos testes comportamentais, o tratamento preventivo e repetido com AR inibiu significativamente o tempo de imobilidade no TSC ($p < 0,05$, $d = 1,328$, Figura 15B) comparado ao grupo LPS, sendo que nenhuma alteração significativa foi evidenciada nos parâmetros de latência para imobilidade e número de imobilidade (Figura 15A e C, respectivamente). Adicionalmente, o tratamento com AR reduziu o tempo de latência para o início do *grooming* ($p < 0,05$; $d = 1,332$, Figura 15D) e no número de *grooming* ($p < 0,05$; $d = 1,267$, Figura 15F), porém sem alterações no tempo total de *grooming* (Figura 15E) durante o ST quando comparado ao

grupo LPS. De maneira interessante, o tratamento repetido com AR não induziu alteração locomotora nos animais durante o período avaliado (Figura 15G e H).

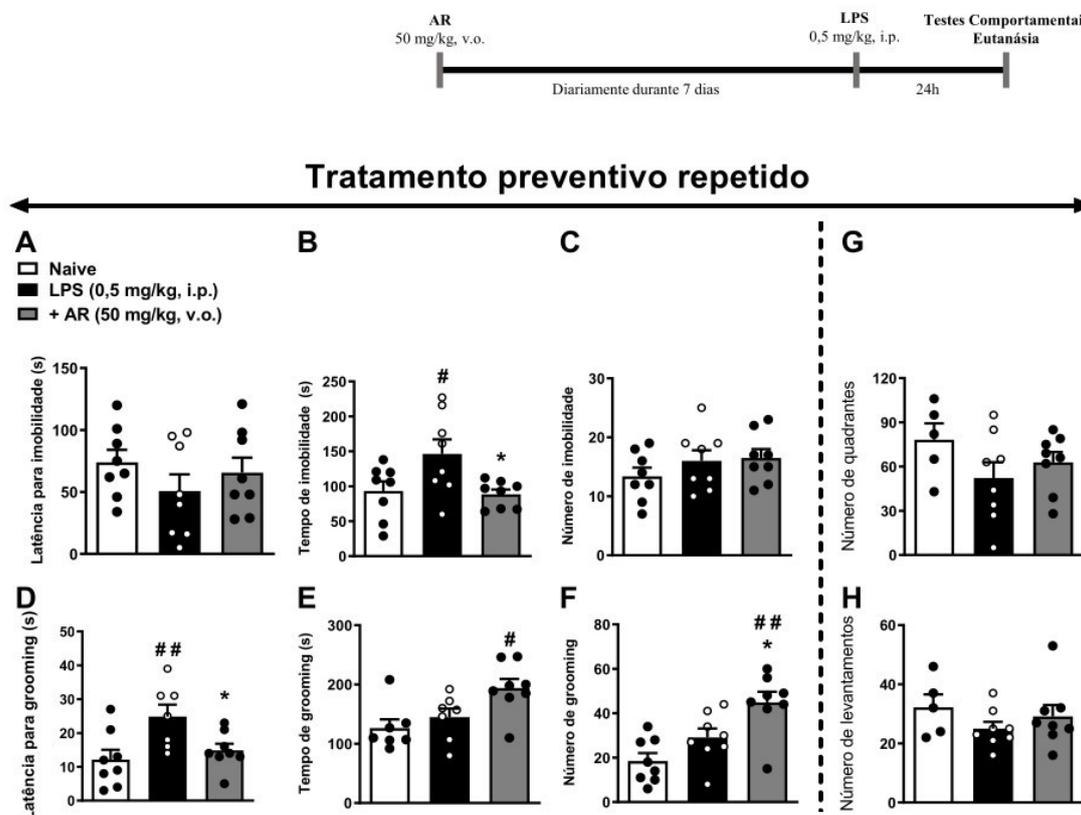


Figura 15. Influência do tratamento preventivo repetido do AR no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. Os animais foram tratados com AR (50 mg/kg, v.o.) diariamente durante sete dias anterior à estimulação periférica com LPS (0,5 mg/kg, i.p.), e avaliados no teste de suspensão pela cauda (A-C), *splash test* (D-F) e no teste do campo aberto (G e H). Os dados foram expressos como média \pm EPM de 5-8 animais/grupo. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ apresenta diferença significativa comparada ao grupo naive; * $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS (ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni)

Por fim, investigou-se o efeito terapêutico do AR no modelo de depressão induzida pela administração periférica de LPS. Para isso, os animais foram devidamente tratados com AR (50 mg/kg, v.o.) 23 horas posterior ao estímulo com LPS. Conforme ilustrado na Figura 16, o tratamento terapêutico com o AR (50 mg/kg, v.o.), bem com a administração da imipramina (20 mg/kg, i.p.), reduziram significativamente o tempo de imobilidade no TSC ($p < 0,01$, $d_{AR} = 1,47$, $d_{imipramina} = 2,112$, Figura 16A) quando comparado ao grupo LPS, porém nenhuma alteração foi observada no número de imobilidade (Figura 16B). Em relação aos parâmetros avaliados no ST, nenhuma alteração significativa foi observada dentre os tratamentos (Figura 16C e D).

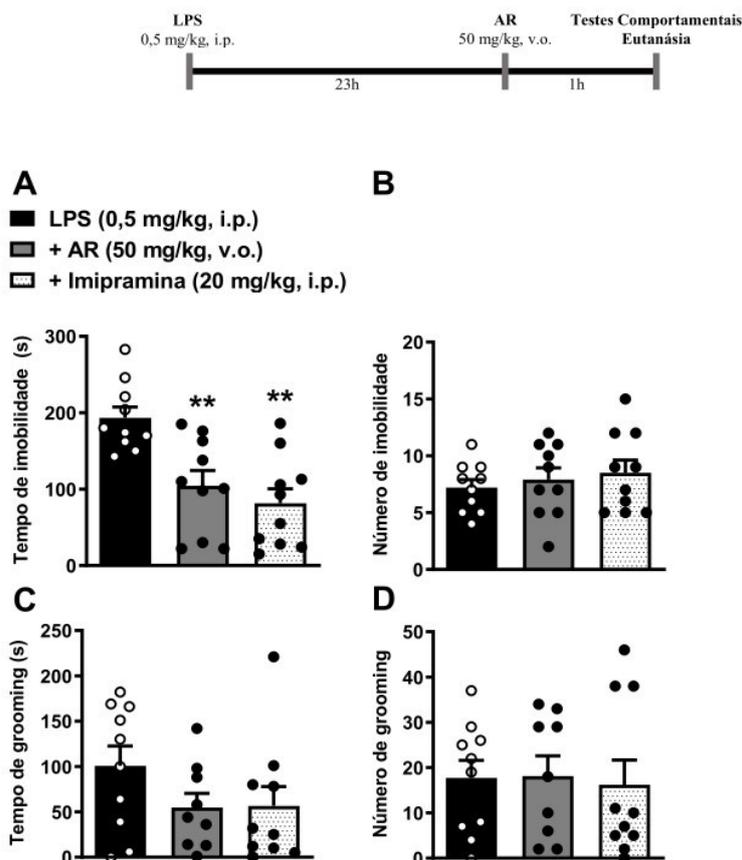


Figura 16. Influência do tratamento terapêutico com AR no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. O AR (50 mg/kg, v.o.) foi administrado 23 horas posterior ao estímulo inflamatório periférico induzido por LPS (0,5 mg/kg, i.p.). Os animais foram avaliados no teste de suspensão pela cauda (A e B) e no *splash test* (C e D). Os dados foram expressos como média ± EPM de 8 animais/grupo. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo LPS (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni).

7.3.2 Envolvimento da sinalização dependente dos receptores canabinoides e PPAR- γ no efeito tipo-antidepressivo do AR

Conforme os resultados dos protocolos anteriores, a administração oral do AR (50 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC ($p < 0,01$, Figura 17A) e aumentou o tempo de *grooming* no ST ($p < 0,05$, Figura 17C) quando comparado ao grupo LPS. Interessantemente, o pré-tratamento com os antagonistas CB1R (AM281 – 1 mg/kg, i.p.) ou CB2R (AM630 – 1 mg/kg, i.p.) preveniram significativamente o efeito antidepressivo do AR no tempo de imobilidade durante o TSC (Figura 17A) quando comparado ao grupo AR. Nenhuma alteração foi observada no número de imobilidade durante o TSC (Figura 76B) e nos parâmetros referentes ao comportamento tipo-anedônico – tempo de *grooming* (Figura 17C) e número de *grooming* (Figura 17D).

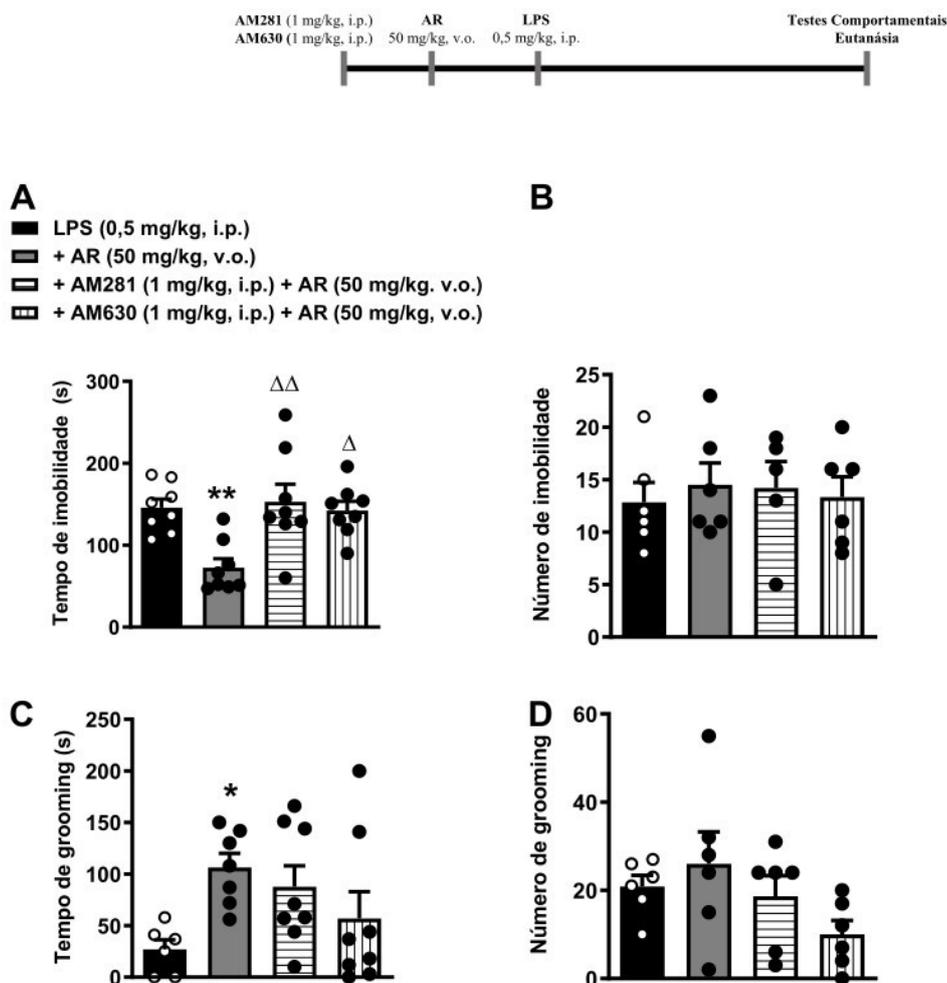


Figura 17. Envolvimento dos receptores CB1 e CB2 no efeito tipo-antidepressivo do AR. Os antagonistas AM281 (1 mg/kg, i.p.) e AM630 (1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 minutos antes do AR (50 mg/kg). Os animais receberam a injeção com LPS (0,5 mg/kg, i.p.) 1 hora depois do AR e o teste de suspensão pela cauda (A e B) e *splash test* (C e D) foram realizados 24 horas posterior a administração do LPS. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 5-8 animais/grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ apresenta diferença significativa comparada ao grupo LPS; $\Delta p < 0,05$ e $\Delta\Delta p < 0,01$ comparado ao grupo AR (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni).

Por fim, investigou se a via de sinalização mediada pelo fator de transcrição PPAR- γ poderia estar relacionada ao efeito tipo-antidepressivo evidenciado pelo AR. Conforme ilustrado na Figura 18, a injeção do antagonista PPAR- γ (GW9662 – 1 mg/kg, i.p.) bloqueou o efeito do AR no comportamento tipo-antidepressivo dos animais induzidos com LPS. Em comparação ao grupo AR, a pré-administração de GW9662 aumentou significativamente o tempo de imobilidade no TSC ($p < 0,01$, Figura 18A), bem como reduziu o tempo de *grooming* no ST ($p < 0,05$, Figura 18C). Entretanto, nenhuma alteração no número de imobilidade (TSC, Figura 18B) e no número de *grooming* (ST, Figura 18D) foi observada dentre os grupos experimentais.

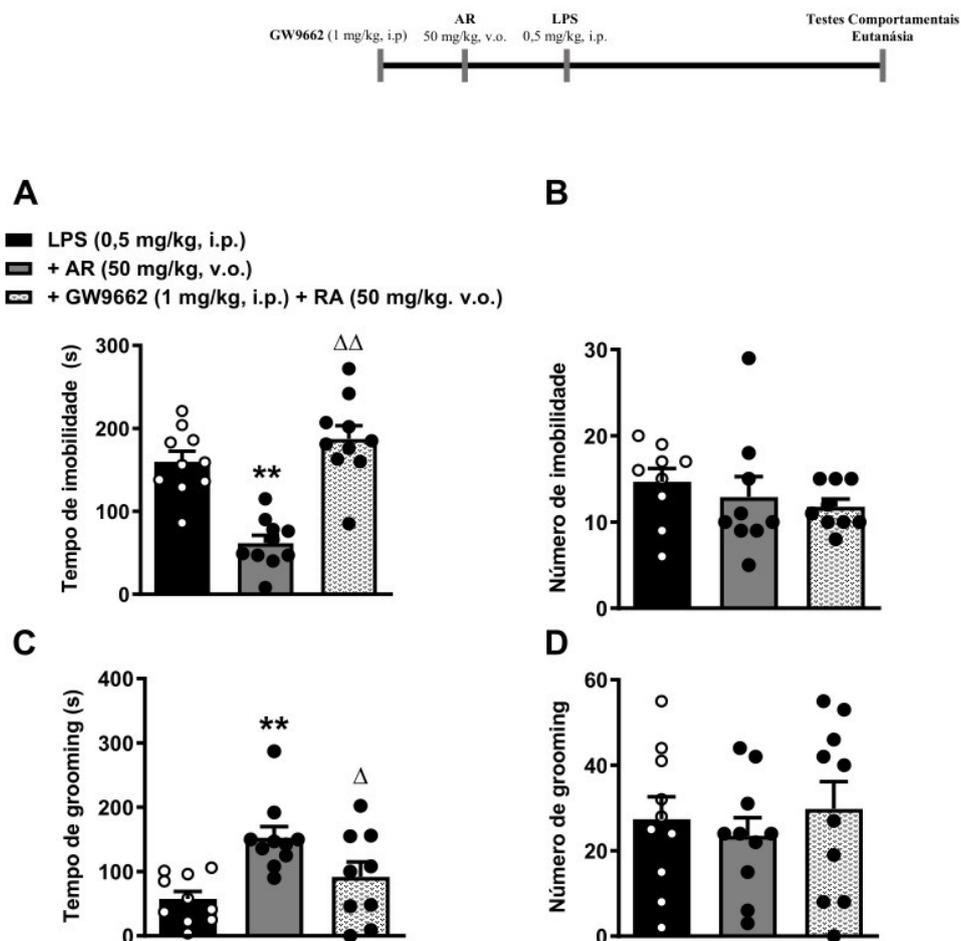


Figura 18. Envolvimento da via de sinalização dependente do fator de transcrição PPAR- γ no efeito tipo-antidepressivo do AR. O antagonista GW9662 (1 mg/kg, i.p.) foi administrado 30 minutos antes do AR (50 mg/kg, v.o.). Os animais receberam a injeção com LPS (0,5 mg/kg, i.p.) 1 hora depois do AR e o teste de suspensão pela cauda (A e B) e *splash test* (C e D) foram realizados 24 horas posterior a administração do LPS. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 9-10 animais/grupo. ** $p < 0,01$ apresenta diferença significativa comparada ao grupo LPS; $\Delta p < 0,05$ e $\Delta\Delta p < 0,01$ comparado ao grupo AR (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni).

8 DISCUSSÃO

O TDM é uma patologia neuropsiquiátrica crônica e prevalente que gera grande comprometimento cognitivo e emocional ao indivíduo acometido, estando associada à alta taxa de recorrência, morbidade, suicídio e, conseqüentemente, à perda da qualidade de vida (LI, 2020). Dentro do planejamento terapêutico, a farmacoterapia ainda é a principal conduta evidenciada na prática clínica, estando ou não associada à psicoterapia (CUIJPERS *et al.*, 2019). Apesar dos métodos farmacológicos se mostrarem efetivos, ainda é relatada na literatura baixa remissão da doença e não adesão ao tratamento, fato que leva o paciente à procura de medidas alternativas que auxiliem o tratamento convencional (HALLER *et al.*, 2019). Portanto, os compostos de origem vegetal se tornam nicho de investimento bastante

interessante e promissor na pesquisa, sendo associados à visão de que são moléculas mais seguras, com menor risco de desenvolver efeitos adversos e abstinência quando comparados aos fármacos tradicionais (YEUNG *et al.*, 2018). Nesse sentido, atividades biológicas estão associadas ao AR, incluindo antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória (LUO *et al.*, 2020). Aliado a essas propriedades, a literatura científica também relata a atividade tipo-antidepressiva do AR (GHASEMZADEH RAHBARDAR; HOSSEINZADEH, 2020; NADEEM *et al.*, 2019). Portanto, os resultados descritos nesse estudo evidenciam os potenciais efeitos biológicos do AR, juntamente com os possíveis alvos moleculares de ação. Adicionalmente, dados *in vivo* aqui descritos indicam que o efeito tipo-antidepressivo do AR, envolve vias de sinalização mediada pela ativação dos receptores canabinoides e PPAR- γ , muito embora o mecanismo pelo qual ocorre essa interação ainda permanece desconhecido.

Recentemente, as metodologias *in silico* se tornaram abordagens interessantes na pesquisa científica e, por meio da utilização de ferramentas de baixo custo e rápida execução, são capazes de gerar uma grande quantidade de dados, bem como reduzir e otimizar o número de animais utilizados durante a experimentação *in vivo* (BOJARSKA *et al.*, 2020). Esses métodos estão incorporados ao processo de desenvolvimento e planejamento de novos compostos bioativos, permitindo a obtenção do perfil físico-químico, farmacocinético, farmacodinâmico e toxicológico de inúmeros protótipos de moléculas com potenciais terapêuticos (ANDRADE *et al.*, 2016). Diversas ferramentas de bioinformática estão disponíveis com diferentes graus de complexidade, e a interação entre os dados gerados podem direcionar o planejamento experimental, seja para o estudo do comportamento da droga no organismo – perfil farmacocinético – ou para os mecanismos de ação em alvos específicos – perfil farmacodinâmico (SANTANA *et al.*, 2021; TOMAR *et al.*, 2018). Neste trabalho foi utilizada a combinação de duas plataformas online de livre acesso – *Swiss ADME* e *ADMET-SAR* (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017; YANG *et al.*, 2019) – validadas e bastante aplicadas na literatura científica, com o objetivo de obtenção das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológica do AR. O AR foi considerado forte candidato para a via de administração oral, seguindo a RO5 e o filtro de Ghose, os quais estabelecem que para uma molécula ter boa absorção e permeação no organismo deve apresentar não mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, 10 receptores de ligação de hidrogênio, peso molecular menor que 500 Daltons, LogP menor que 5, refratividade molar entre 40 e 130, e número total de átomos entre 20 e 70 (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; LIPINSKI *et al.*, 2012). Portanto, o conjunto de dados apresentados referente às análises ADMET sugerem

que o AR possui mínima probabilidade de apresentar dificuldades associadas à biodisponibilidade e toxicidade.

No processo de desenvolvimento de novas moléculas ativas, outro aspecto crítico e de fundamental importância é a identificação de potenciais alvos moleculares, os quais estão associados ao mecanismo de ação e eficácia do composto (CHOUDHARY; SINGH, 2019). Nesse sentido, as análises aqui propostas obtidas pelas plataformas *Swiss Target Prediction* e *PASS online* indicam mais de 50 possíveis alvos de ligação do AR, incluindo aqueles relacionados à ação antidepressiva. Os subtipos de matrix metaloproteinases desempenham papel importante no processo de arborização dendrítica em células piramidais e na formação de espinhos dendríticos (ALAIYED; CONANT, 2019). No entanto, em condições patológicas incluindo a depressão, é observada correlação positiva entre a concentração dessas proteínas, principalmente a MMP-9, com a severidade e qualidade de vida de pacientes diagnosticados com MDD (BEROUN *et al.*, 2019; VAFADARI; SALAMIAN; KACZMAREK, 2016; YOSHIDA *et al.*, 2012). Outro possível alvo de ligação do AR é a proteína Janus kinase (JAK) 2, a qual está envolvida no processo de transdução de sinais de receptores de citocinas (CHOY, 2019), interferindo em diferentes funções no SNC e relacionadas à fisiopatologia dos transtornos de humor (SHARIQ *et al.*, 2019). Adicionado ao contexto de alvos moleculares do AR, os receptores CB1R e CB2R, bem como o fator de transcrição PPAR- γ também foram relacionados nessas análises, o que os tornam interessante objeto de investigação desse trabalho.

Dentre as atividades biológicas atribuídas ao AR, a propriedade antioxidante pode ser considerada um grande destaque dessa molécula. O dano oxidativo está intimamente relacionado à fisiopatologia do TDM, o qual é caracterizado pelo desequilíbrio entre moléculas antioxidante e oxidante do organismo, em favor desse último (BLACK *et al.*, 2015; VAVÁKOVÁ; URAČKOVÁ; TREBATICKÁ, 2015). A produção excessiva de EROs e ERNs estão associadas ao dano celular, que incluem processos de oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e alterações no DNA. Especificamente no SNC, os agente oxidantes estão relacionados à degeneração neuronal e modulação de sinapses, resultando no desenvolvimento de neuroinflamação e consequente morte celular (HUSSAIN *et al.*, 2016). Por meio da metodologia de redução do DPPH, os resultados aqui demonstrados evidenciam significativa atividade antioxidante do AR ($CI_{50} = 0,916 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$) quando comparado ao padrão de referência resveratrol ($CI_{50} = 8,45 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$). Nesse contexto é estabelecido relação inversamente proporcional entre CI_{50} e o potencial antioxidante, ou seja, quanto menor a CI_{50} maior a capacidade de sequestro de EROs da molécula estudada (GULCIN,

2020). Estudos da literatura corroboram com esses achados, tal como o estudo de Tacchini e colaboradores (2020), os quais observaram a atividade antioxidante do AR com CI_{50} equivalente a $4,31 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$ através da utilização da mesma metodologia aqui apresentada. Em modelo inflamatório de células mononucleares sanguíneas periféricas induzido por LPS, o AR (10, 20, 40 e 80 μM) foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica e produção de óxido nítrico, bem como recuperou a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) (SADEGHI *et al.*, 2020). Nesse contexto, os polifenóis – classe de compostos pertencentes ao metabolismo secundário de plantas na qual o AR está incluso – estão diretamente relacionados à atividade antioxidante. Mecanismos distintos estão atrelados à essa atividade, dentre eles podem ser destacados: i) a capacidade dos polifenóis em quelar íons de metais de transição (Fe^{+2} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ti^{3+} e Cr^{5+}) evitando a formação de radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio; ii) indução da síntese de enzimas antioxidantes, incluindo a SOD, catalase e GPx; e por fim, iii) a inibição da cadeia respiratória mitocondrial e ATPase e, conseqüente redução na produção de EROs (YAHFOUFI *et al.*, 2018).

Além da propriedade antioxidante evidenciada pelo AR, o efeito anti-inflamatório é outra atividade biológica bastante explorada na literatura científica e que pode estar relacionada à ação antidepressiva observada nesse estudo. Nessa perspectiva, Wei e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos do AR (40, 60 e 80 mg/kg) em modelo de neuroinflamação induzida pela administração intracerebroventricular de LPS em camundongos C57Bl/6. Os autores observaram a redução significativa na concentração de mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF, IL-6, IL-1 β , COX-2 e iNOS, bem como a redução da expressão de TLR4, CD14, supressão da via de ativação mediado pelo NF- κ B e do inflamossoma NLRP3. Ainda nesse contexto, a administração do AR reduziu significativamente os marcadores inflamatórios COX-2, PGE-2, IL-1 β , MMP-2 e NO em modelo de dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático em ratos (GHASEMZADEH RAHBARDAR *et al.*, 2017). Em adição a esses dados, o efeito anti-inflamatório do AR também foi descrito em outros estudos utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* (JIANG *et al.*, 2018; LV *et al.*, 2019; SADEGHI *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2020). Interessantemente, na análise do líquido cefalorraquidiano e sangue periférico de pacientes diagnosticados com TDM foi constatado aumento na concentração de marcadores inflamatórios, tais como prostaglandinas, IL-6, IL-1 β , TNF, e IFN- α (WOELFER *et al.*, 2019), os quais também são observados após administração sistêmica de LPS (ZHANG *et al.*, 2019). Esses marcadores interferem diretamente na neuroplasticidade, através da diminuição

na expressão de BDNF; promovem mudanças no sistema dopaminérgico; e estão relacionados à alterações no sistema serotoninérgico, através da interferência no metabolismo do triptofano (DOOLEY *et al.*, 2018). Os achados acima destacados, corroboram com os dados *in silico* obtidos nesse estudo, em particular àqueles referentes aos potenciais alvos moleculares de ligação do AR, particularmente MMPs, COX-1 e COX-2, receptor de tirosina cinase, PPAR- α , CB1R e CB2R. Portanto, o efeito tipo-antidepressivo do AR aqui observado pode estar associado à redução da neuroinflamação, bem como às alterações no panorama oxidativo no SNC, muito embora, análises adicionais são necessárias para confirmar e/ou refutar tais hipóteses.

Arelada à modulação do processo inflamatório, a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) também pode estar associada com a ação tipo-antidepressiva evidenciada pelo AR. O reflexo inflamatório detém importante papel nesse processo, o qual caracteriza-se pela via aferente do nervo vago que detecta alterações e sinais inflamatórios, e a via eferente conhecida como anti-inflamatória colinérgica (DI BARI *et al.*, 2017). A acetilcolina (ACh) liberada pelas terminações nervosas do nervo vago se liga a receptores de acetilcolina $\alpha 7$ nicotínicos ($\alpha 7$ nAChR) presente em células do sistema imunológico, incluindo macrófagos e microglia. Através dessa interação, ocorre o influxo de Ca^{2+} , consequente ativação do NF- κ B, resultando na supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, proteínas do complexo de alta mobilidade (HMGB, do inglês *high mobility group box of proteins*) e IL-6 (POHANKA, 2014). Após a ACh exercer sua função, essa será hidrolisada principalmente pela enzima AChE em colina e ácido acético, contribuindo para regulação do tônus colinérgico (VAKNINE; SOREQ, 2020). Dessa forma, moléculas capazes de inibir a AChE contribuem para: i) o aumento da concentração de ACh na fenda sináptica; ii) possuem efeito na redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias; iii) bem como auxiliam na manutenção da concentração de ACh objetivando compensar a redução de AChR em doenças neurodegenerativas e/ou no estado inflamatório do organismo (HALDER; LAL, 2021). Portanto, compostos que interferem no sistema colinérgico são alternativas interessantes para auxiliar a terapêutica de doenças neuropsiquiátricas e/ou neurodegenerativas, principalmente aquelas que estabelecem um quadro neuroinflamatório. Inibidores da AChE tradicionalmente disponíveis no mercado, tais como fisostigmina, neostigmina e galantamina, já são referenciados na literatura com atividade na redução da neuroinflamação, principalmente no córtex e hipocampo, bem como na melhora da cognição e plasticidade sináptica em modelos pré-clínicos (KALB *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018). No presente estudo foi evidenciado significativa inibição da AChE (58%)

(AZMAN *et al.*, 2020) e CI_{50} de 1,164 $\mu\text{g/mL}$ pelo AR. Esses dados estão de acordo com estudos prévios, principalmente relacionados a extratos vegetais os quais apresentam o AR como composto majoritário. A administração crônica durante 28 dias de AR (10 mg/kg, p.o.) e extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* (200 mg/kg, p.o.) foi capaz de reduzir a atividade AChE nas regiões cerebrais do córtex e hipocampo em ratos *Wistar* submetidos ao modelo de perda de memória por escopolamina (OZAROWSKI *et al.*, 2013). Posteriormente, esses dados foram reforçados por Ferlemi e colaboradores (2015), os quais evidenciaram a redução da atividade da AChE em distintas regiões cerebrais, incluindo o córtex, mesencéfalo, cerebelo, estriado e hipocampo em camundongos Balb-c tratados com 2% (peso/volume) do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*. Em continuidade, outras espécies vegetais contendo o AR como marcador, incluindo *Onosma bourgaei* (Boiss.) e *Onosma trachytricha* (Boiss.), são referenciadas com atividade na inibição da AChE (ISTIFLI, 2021). Diante dos aspectos supracitados e os resultados aqui apresentados, é sugerido que o AR pode interferir na transmissão colinérgica, contribuindo como uma abordagem potencial na prevenção e/ou tratamento da neuroinflamação, bem como na modulação do comportamento tipo-depressivo em animais.

De acordo com os dados *in silico* e *in vitro* aqui relacionados e suportados por evidências da literatura, torna-se possível sugerir que o AR apresenta potencial efeito antidepressivo, e que o sistema endocanabinoide possa estar envolvido como uma possível via de ação dessa molécula. Logo, por meio da utilização do modelo de depressão induzida por LPS essa proposição foi posteriormente validada *in vivo*. A administração periférica de LPS é capaz de induzir uma resposta imune que culmina com a ativação microglial com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (AN *et al.*, 2020). Camundongos expostos ao LPS desenvolvem comportamento tipo-depressivo 24 horas posterior ao estímulo, sem comprometimento motor (HUANG *et al.*, 2019; LIEBERKNECHT *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2019). Os resultados aqui demonstrados indicam que o AR possui efeito tipo-antidepressivo, por meio da redução significativa do tempo de imobilidade dos animais no TSC, bem como redução do comportamento tipo anedônico no ST. Ainda, a análise do tamanho da amostra reforça os dados referentes ao comportamento tipo-antidepressivo do AR. Esse parâmetro relaciona a magnitude do efeito observado como métrica padronizada, indicando os possíveis efeitos reais práticos evidenciados através dos resultados (LAKENS, 2013). O tamanho da amostra é classificado de acordo com o valor de d de Cohen em pequeno efeito ($0,2 < d < 0,5$), médio efeito ($0,5 < d < 0,8$) e grande efeito ($d > 0,8$) (COHEN, 1988; TACEY *et al.*, 2020). Nesse sentido, os dados aqui apresentados indicam grande efeito

em ambos os testes comportamentais realizados (TSC e ST), com variação de 1,199 a 1,985. O tamanho do efeito induzido pelo controle positivo (imipramina) foi similar àquele apresentado pelo AR, classificado de médio a grande efeito ($0,743 < d < 2,112$). Esses dados vão ao encontro àqueles observados por Takeda e colaboradores (2002), os quais evidenciam redução significativa no tempo de imobilidade no teste nado forçado em camundongos tratados com AR *per se* (2 mg/kg, i.p.). Kondo e colaboradores (2015) também investigaram o efeito *per se* do AR (5 e 10 mg/kg, v.o.) administrado diariamente durante 7 dias e observaram redução significativa no tempo de imobilidade no TSC em camundongos ICR. Os mesmos autores destacam que esse efeito está associado à redução da concentração sérica de corticoesterona, aumento de dopamina nas áreas do sistema límbico, modulação da proteína quinase ativada por mitógeno fosfatase 1 (MKP-1, do inglês *mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*), bem como aumento de BDNF e das enzimas tirosina hidroxilase e piruvato carboxilase em áreas do sistema límbico. Ainda no contexto da avaliação tipo-antidepressiva do AR, Ghazizadeh e colaboradores (2020) observaram esse efeito através da administração crônica (14 dias) do extrato hidroalcoólico de *Melissa officinalis* (75 e 100 mg/kg, v.o., 5,1 % - peso/peso de AR) no TSC e NF em modelo pré-clínico de estresse por contenção. Outro estudo destaca mudanças comportamentais significativas no NF e labirinto aquático de Morris em animais submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível e tratados com AR (10 mg/kg, i.p.) (JIN *et al.*, 2013). Como citado anteriormente, outros pesquisadores evidenciaram o efeito do AR de forma isolada, bem como em extratos vegetais que contém essa molécula em sua composição, no comportamento tipo depressivo em modelos pré-clínicos (ITO *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2009, 2012b; SASAKI *et al.*, 2013). Nesse contexto, o efeito tipo-antidepressivo evidenciado pelo AR corroboram com os resultados aqui apresentados, muito embora os dados aqui apresentados sejam pioneiros na investigação do comportamento tipo-antidepressivo do AR em modelo inflamatório de depressão.

Na avaliação tipo-antidepressiva aqui apresentada é importante destacar que a dose de AR (50 mg/kg) usada não apresentou toxicidade oral. De acordo com estudo prévio realizado por Nascimento e colaboradores (2020), a dose letal de 50% (DL₅₀) do AR é aproximadamente 2500 mg/kg em camundongos. Os autores também observaram que a administração de 300 a 2000 mg/kg de AR: i) não alterou aspectos comportamentais dos animais; ii) não induziu diferença significativa no peso dos órgãos (fígado, coração, rins e baço); iii) tampouco na ingestão de água e comida quando comparado ao grupo controle. Adicionalmente, o AR pode ser classificado com baixa toxicidade de acordo com o sistema harmonizado global (GSH, do inglês *Globally Harmonized System*) de classificação e

rotulagem de substâncias químicas (UNITED NATIONS, 2017), inserido dentro da categoria 5 que compreende substâncias com DL_{50} entre 2000 e 5000 mg/kg. Interessantemente, outro ponto importante de discussão, dentro do desenvolvimento de novas moléculas com objetivo terapêutico ou preventivo, é a dose translacional entre espécies de animais distintas em estudos pré-clínicos. O *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu a normalização da área da superfície corporal (mg/m^2) para propor a extrapolação das doses entre animais e humanos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007). Nesse sentido, a dose equivalente em humano (DEH) pode ser calculada usando a seguinte equação: $DEH (mg/kg) = dose animal (mg/kg) \times (K_m do animal / K_m humano)$, onde K_m equivale ao fator de correção para camundongo e humano, com valor de 3 e 37, respectivamente (NAIR; JACOB, 2016). Considerando a aplicação dessa fórmula, para uma pessoa de 60 kg, o valor da DEH seria de 4,05 mg/kg com uma ingestão diária de 243 mg de AR. Portanto, esses dados sugerem que esta dose pode ser alcançada por uma suplementação oral diária com esse polifenol.

Em contrapartida à atividade antidepressiva já documentada na literatura científica, os mecanismos pelos quais o AR desenvolve essa ação ainda não são estabelecidos. No estudo de revisão, realizado por Hillard e Liu (2014) foram observadas evidências que suportam a participação do SEC no desenvolvimento de sintomas depressivos e, conseqüentemente, mimetizam comportamento depressivo em humanos. Logo, compostos capazes de modular esse sistema se tornam uma alternativa para o tratamento da depressão resistente e recorrente. Através dos resultados aqui apresentados, as análises *in silico* indicam que o AR pode interagir com os receptores CB1R e CB2R, sendo esse fato confirmado pelos experimentos *in vivo*. A administração de AM251 (1 mg/kg, i.p.) e AM630 (1 mg/kg, i.p.) previamente ao tratamento com AR bloqueou os efeitos induzidos pelo AR no TSC e ST em animais submetidos ao modelo de depressão por LPS. Estudos prévios indicam que a ativação direta ou indireta dos receptores canabinoides estão associados com atividade antidepressiva (ADAMCZYK *et al.*, 2008; HILLARD; LIU, 2014; MICALÉ *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2020). Hill e Gorzalka (2005) observaram redução do tempo de imobilidade no NF de animais tratados com HU-210 (agonista CB1R) com resultado comparável ao controle positivo desipramina. Ainda, Haj-Mirzaian e colaboradores (2017) observaram que a administração de WIN55,212-2 (agonista não seletivo de receptores canabinoides) reduziu o comportamento tipo-depressivo em animais submetidos ao estresse por isolamento social. Por outro lado, a co-administração com os antagonistas AM251 e AM630 reverteu os efeitos antidepressivos induzidos pelo WIN55,212-2. Um aspecto que se torna importante destacar são as regiões do SNC em que os CB1Rs são expressos. Esse receptores são principalmente

identificados na membrana pré-sináptica de neurônios excitatórios e inibitórios nas regiões dos gânglios basais, núcleo *acumbens*, córtex, cerebelo e amígdala, aos quais estão envolvidos em atividades fisiológicas essenciais, incluindo regulação da plasticidade sináptica, humor, percepção, cognição e locomoção tanto em humanos quanto em animais (BRUNT; BOSSONG, 2020; CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020). Em comparação ao CB1R, o CB2R está expresso em menor quantidade no SNC. Este receptor foi identificado no terminal axônico de neurônios GABAérgicos na área tegumentar ventral (VTA) e hipocampo, bem como na membrana pós-sináptica de neurônios na VTA, hipocampo e córtex pré-frontal (CHEN *et al.*, 2017). Notavelmente, dados da literatura indicam que os receptores CB2R podem interferir no comportamento tipo-depressivo. Nesse contexto foi identificado a expressão de RNAm de CB2R em neurônios dopaminérgicos da VTA de animais, sendo que a deleção desses receptores foi capaz de modular o comportamento tipo-depressivo dos animais (LIU *et al.*, 2017). Da mesma forma, a administração de β -cariofileno (agonista seletivo CB2R) reduziu o tempo de imobilidade no TSC e NF, e interessadamente o pré-tratamento com AM630 bloqueou esse efeito (BAHI *et al.*, 2014). Sahu e colaboradores (2019) também evidenciaram que a administração oral aguda e diária durante 7 dias de 1-fenilisatina (agonista CB2R) reduziu a neuroinflamação e o comportamento “tipo doentio” induzido por LPS, evidenciado pela redução de TNF e dano oxidativo, bem como pelas análises do TSC, NF e TCA, respectivamente. Portanto, esses dados da literatura, aliado aos resultados aqui apresentados, sugerem que a modulação dos receptores CB1R e CB2R podem estar associados ao mecanismo de ação antidepressivo do AR.

Outro dado que reforça o envolvimento do SEC na atividade antidepressiva é o fato de que a terapia com antidepressivos tradicionais são capazes de modular a atividade dos receptores canabinoides. No estudo pré-clínico conduzido por Smaga e colaboradores (2017), os autores evidenciaram que a administração diária durante 14 dias de imipramina (15 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) e tianeptina (10 mg/kg) foram capazes de regular a expressão de CB1R e CB2R em áreas específicas do SNC, incluindo o córtex pré-frontal, hipocampo, estriado dorsal, núcleo *acumbens* e cerebelo. Interessantemente, evidências recentes indicam que a administração conjunta de doses subefetivas de ligantes canabinoides, incluindo oleamida, AM251 e AM630, aumentaram os efeitos tipo-antidepressivos de fármacos antidepressivos convencionais que atuam no sistema monoaminérgico, por meio da avaliação do TSC e NF (POLESZAK *et al.*, 2019, 2020). Trabalhos prévios também sugerem que exista uma relação entre a atividade dos receptores canabinoides e a liberação de neurotransmissores no SNC, incluindo dopamina (DA), 5-HT, GABA e glutamato (BRUNT;

BOSSONG, 2020; LE BOISSELIER *et al.*, 2017). Nesse sentido, a administração de JWH-018 (agonista CB1R e CB2R) aumentou a concentração de DA no núcleo *acumbens* de ratos *Sprague Dawley*, sendo que os antagonistas CB1R (SR-141716A e AM251) bloquearam esse efeito. Ainda, esse mesmo estudo, destacou por meio de abordagem *ex vivo* que neurônios dopaminérgicos da VTA tratados com JWH-018 reduziu a corrente pós-sináptica mediada por GABA, sugerindo que o aumento de DA observado *in vivo* poderia ser decorrente da desinibição de neurônios dopaminérgicos (DE LUCA *et al.*, 2015). Nesse mesmo contexto, Franklin e Carrasco (2013) também demonstraram que animais tratados durante 7 dias com CP55,940 (agonista não seletivo dos receptores canabinoides) aumentou significativamente a concentração dos receptores 5-HT_{2A}, bem como a expressão do respectivo RNAm no córtex pré-frontal. Similar efeito foi observado em cultura de células neuronais CLU213 e A1A1v tratadas com GP1a (agonista seletivo CB2R) sendo esse efeito, possivelmente, atribuído à ativação da via de sinalização da cinase extracelular 1/2 (ERK1/2). Em conjunto aos dados *in silico* e *in vivo* aqui apresentados, o efeito tipo-antidepressivo do AR pode estar relacionado à modulação dos receptores canabinoides, sugerindo esse composto como possível candidato a ligante canabimimético tornando-o uma alternativa terapêutica promissora e/ou molécula com potencial na terapia combinada para o tratamento do TDM.

Ademais, classes de compostos isolados de origem vegetal são importantes fontes de novas moléculas com potenciais terapêuticos. O AR é classificado como polifenol derivado do ácido cafeico e do ácido dihidroxifenil lático (FACHEL *et al.*, 2019) – classe de compostos que estão relacionados a distintas atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante e antitumoral (YAHFOUFI *et al.*, 2018). Nessa perspectiva, evidências científicas indicam que compostos pertencentes a essa classe são capazes de modular o SEC. Oliveira e colaboradores (2019) demonstraram que o resveratrol (100 µg/pata) induziu ação antinociceptiva em modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, sendo esse efeito antagonizado pelo pré-tratamento com AM251. Outro estudo pré-clínico demonstrou que a administração crônica durante 4 semanas de curcumina (150 mg/kg) aumentou a liberação do fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*) no cérebro de ratos, bem como elevou a concentração de endocannabinoides em regiões cerebrais específicas – incluindo o córtex frontal, hipocampo, amígdala e bulbo olfatório (HASSANZADEH; HASSANZADEH, 2012). Os compostos citados acima são classificados como polifenóis e, aliados a outras moléculas de origem vegetal da mesma classe, como quercetina, catequina, kaempferol e cianidina, apresentam possível ação canabimimética (GONÇALVES *et al.*, 2020a; KUMAR *et al.*, 2019). Aliado

aos dados moleculares *in silico* aqui apresentados que demonstram o CB1R e CB2R como possíveis ligantes do AR, em conjunto a similaridade estrutural dos polifenóis acima citados com o AR e a reversão do comportamento tipo-antidepressivo do AR após a administração de antagonistas canabinoides, é possível sugerir que o efeito tipo-antidepressivo do AR pode estar associado ao SEC.

Evidências na literatura indicam que alguns ligantes canabinoides são capazes de ativar diferentes isoformas do fator de transcrição PPAR (α , β e γ) (O'SULLIVAN, 2016; PAYANDEMEHR *et al.*, 2015; YOUSSEF; EL-FAYOUMI; MAHMOUD, 2019). Esses receptores são fatores de transcrição dependentes de ligantes que formam heterodímeros com o receptor retinóide X e são responsáveis pela alteração de expressão de genes através da ligação em regiões específicas do DNA (O'SULLIVAN, 2016). Mais especificamente, o PPAR- γ está associado a diferentes atividades biológicas que envolvem metabolismo, resposta inflamatória e diferenciação celular (COLLE *et al.*, 2016). Devido à expressão desse receptor em diferentes áreas do SNC, incluindo o córtex piriforme, amígdala, VTA, núcleo *acumbens* e gânglios da base, bem como em subtipos celulares como os neurônios dopaminérgicos, astrócitos e microglia, algumas evidências indicam o PPAR- γ como um potencial alvo para a terapia de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, incluindo o TDM (PRASHANTHA KUMAR *et al.*, 2020; TUFANO; PINNA, 2020). Portanto, além das atividades anti-inflamatória, antioxidante, anti-colinesterase e o possível envolvimento do SEC no mecanismo de ação tipo-antidepressivo do AR, outro aspecto interessante explorado nesse trabalho foi a investigação da via de sinalização mediada pelo PPAR- γ no mecanismo tipo-antidepressivo do AR. Os resultados aqui apresentados indicam que o GW9662 (antagonista PPAR- γ) reverteu o efeito tipo-antidepressivo do AR, evidenciado através do aumento significativo do tempo de imobilidade no TSC. Esse achado foi validado pela investigação *in silico* aqui realizada que ilustra os PPARs como possíveis alvos moleculares de interação do AR. Esses dados são consistentes com estudos anteriores, os quais evidenciam a interação entre o AR e PPAR- γ . Zhang e colaboradores (2018) observaram a inibição da fibrose cardíaca em modelo de sobrecarga de pressão em camundongos via ativação da proteína cinase alfa (AMPK α)/Smad3, sendo essa sinalização dependente do PPAR- γ . Nesse mesmo sentido, o AR foi capaz de inibir a fibrose cardíaca em modelo de dano cardíaco induzido por isquemia e reperfusão, através da via de ativação mediada pelo PPAR- γ e redução da sinalização mediada pelo NF- κ B – responsáveis pela inibição da inflamação e apoptose dos cardiomiócitos (HAN *et al.*, 2017). Portanto, aliado ao fato de que o PPAR- γ está intimamente relacionado como potencial alvo para a terapia do TDM, os resultados aqui

apresentados fornecem evidências adicionais que suportam a ideia de que o efeito tipo-antidepressivo do AR pode estar relacionado à via de sinalização mediada pelo CB1R/CB2R/PPAR- γ .

Diante dos resultados aqui apresentados e discutidos, algumas limitações e perspectivas do estudo podem ser elencadas. Uma das etapas críticas das abordagens aqui apresentadas, foi a dificuldade de estabelecimento das interações específicas entre o AR e os receptores CB1/CB2/PPAR- γ . Um resultado preliminar de *docking* molecular foi realizado através da plataforma SwissDock (<http://www.swissdock.ch/docking>). No entanto, foi observado nessa análise cerca de 37 possíveis sítios de ligação em cada proteína alvo, com diferentes energias livres de Gibbs (ΔG , kcal/mol). Portanto, devido aos resultados inconclusivos e a dificuldade de utilização de outros softwares de *docking* molecular, como o Autodock Vina, estudos posteriores são necessários para melhor investigação dessas interações moleculares. Adicionalmente, outras abordagens no sentido de reforçar o efeito tipo-antidepressivo poderiam ser executadas. Dentre elas, pode-se destacar a determinação de parâmetros bioquímicos, como a concentração dos endocanabinoides AEA e 2AG, bem como de citocinas pró-inflamatórias, BDNF e marcadores oxidativos a nível sérico e em regiões cerebrais, como córtex pré-frontal e hipocampo, no modelo neuroinflamatório de depressão induzido por LPS. Além disso, uma abordagem interessante seria a realização de imunohistoquímica, no sentido de verificar a expressão e localização dos receptores canabinoides nas áreas cerebrais específicas de desenvolvimento da depressão. Por fim, a aplicação de outros modelos pré-clínicos de depressão que envolve outros sistemas, como o modelo induzido por corticoesterona e os modelos estresse agudo ou crônico poderiam enriquecer os dados tipo-antidepressivos aqui apresentados.

9 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo destacam o potencial efeito tipo-antidepressivo do AR, por meio da utilização de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. As avaliações por meio da bioinformática indicam características satisfatórias de biodisponibilidade, sem apresentar efeitos tóxicos, com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e não é substrato para enzimas do complexo CYP450. O AR também parece ser capaz de interagir com diferentes proteínas que desempenham importantes funções no SNC, incluindo os receptores CB1R, CB2R e PPAR- γ . As atividades antioxidante e inibitória da enzima acetilcolinesterase aqui observadas corroboram com as propriedades biológicas associadas ao AR, incluindo a antidepressiva. Os protocolos em modelo animal de depressão induzida por LPS demonstram que o AR protege os animais quanto ao desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo e esse efeito está associado à ativação mediada pelo CB1R/CB2R/PPAR- γ . Diante de todas as evidências aqui demonstradas, é possível sugerir o AR como uma potencial molécula na terapia do TDM, bem como destaca esse polifenol como promissor candidato canabimimético, e reafirma a importância desse sistema na fisiopatologia da depressão.

A partir dos resultados desse estudo, foi elaborado um artigo científico intitulado “*Antidepressant-like effect of rosmarinic acid during LPS-induced neuroinflammatory model: The potential role of cannabinoid receptors/PPAR- γ signaling pathway*”, pelos autores Alexandre Augusto Barros Lataliza, Pollyana Mendonça de Assis, Larissa da Rocha Laurindo, Elaine Cristina Dalazen Gonçalves, Nádia Rezende Barbosa Raposo e Rafael Cypriano Dutra, o qual encontra-se sob processo de revisão pela revista *Phytotherapy Research* (Fator de impacto: 5,878). Nesse momento, agradecemos imensamente a parceria, colaboração e incentivo do professor Dr Adair Roberto Soares dos Santos, que em vida deu suporte ao desenvolvimento desse projeto e fica eternizado em nossas memórias por seu legado na pesquisa científica, por sua generosidade e como referência de profissional, amigo e ser humano.

REFERENCIAS

ADAMCZYK, P. *et al.* Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 217–228, 2008.

ALAGAWANY, M. *et al.* Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 2, p. 167–176, 2017.

ALAIYED, S.; CONANT, K. A role for matrix metalloproteases in antidepressant efficacy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 1–10, 2019.

AMBROSE, T.; SIMMONS, A. Cannabis, Cannabinoids, and the Endocannabinoid System-Is there Therapeutic Potential for Inflammatory Bowel Disease? **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 13, n. 4, p. 525–535, 2019.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5. ed. Arlington, VA, USA: American Psychiatric Publishing, 2013.

AN, J. *et al.* Neuroprotective effects of natural compounds on LPS-induced inflammatory responses in microglia. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 6, p. 2353–2378, 2020.

ANDRADE, E. L. *et al.* Non-clinical studies required for new drug development – Part I: Early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 11, p. 1–9, 2016.

ARAKI, R. *et al.* Kamikihito ameliorates lipopolysaccharide-induced sickness behavior via attenuating neural activation, but not inflammation, in the hypothalamic paraventricular nucleus and central nucleus of the amygdala in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 2, p. 289–294, 2016.

ATHIRA, K. V. *et al.* An Overview of the Heterogeneity of Major Depressive Disorder: Current Knowledge and Future Prospective. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 3, p. 168–187, 2020.

AZMAN, N. A. N. *et al.* Potential anti-acetylcholinesterase activity of cassia timorensis DC. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 1–14, 2020.

BAHI, A. *et al.* β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology and Behavior**, v. 135, p. 119–124, 2014.

BENTO, A. F. *et al.* β -caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153–1166, 2011.

BEROUN, A. *et al.* MMPs in learning and memory and neuropsychiatric disorders. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 16, p. 3207–3228, 2019.

BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression

and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 234–256, 2020.

BLACK, C. N. *et al.* Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–175, 2015.

BOJARSKA, J. *et al.* A supramolecular approach to structure-based design with a focus on synthons hierarchy in ornithine-derived ligands: Review, synthesis, experimental and in silico studies. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1135–1162, 2020.

BRUNT, T. M.; BOSSONG, M. G. The neuropharmacology of cannabinoid receptor ligands in central signaling pathways. **European Journal of Neuroscience**, n. September, p. 1–13, 2020.

BURSTEIN, O. *et al.* Cannabinoids prevent depressive-like symptoms and alterations in BDNF expression in a rat model of PTSD. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 84, n. February, p. 129–139, 2018.

CAMARGO, A.; RODRIGUES, A. L. S. Novel Targets for Fast Antidepressant Responses: Possible Role of Endogenous Neuromodulators. **Chronic Stress**, v. 3, p. 1–13, 2019.

CHEER, J. F. *et al.* Cannabinoids Enhance Subsecond Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Awake Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 18, p. 4393–4400, 2004.

CHEN, D. J. *et al.* Brain cannabinoid receptor 2: Expression, function and modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 3, p. 312–316, 2017.

CHENG, F. *et al.* AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 2012.

CHOUDHARY, N.; SINGH, V. Insights about multi-targeting and synergistic neuromodulators in Ayurvedic herbs against epilepsy: integrated computational studies on drug-target and protein-protein interaction networks. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–23, 2019.

CHOY, E. H. Clinical significance of Janus Kinase inhibitor selectivity. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 58, n. 6, p. 953–962, 2019.

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 1233–1261, 2021.

COCHET, F.; PERI, F. The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2318–2334, 2017.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2. ed. New York, NY: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

COLLE, R. *et al.* PPAR- γ Agonists for the Treatment of Major Depression: A Review.

Pharmacopsychiatry, v. 50, n. 2, p. 49–55, 2016.

CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 9–29, 2020.

CUI, H. Y. *et al.* Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 12, p. 2119–2128, 2018.

CUIJPERS, P. *et al.* Psychological Treatment of Depression in Primary Care: Recent Developments. **Current Psychiatry Reports**, v. 21, n. 12, p. 129–139, 2019.

D'MELLO, C.; SWAIN, M. G. Immune-to-Brain Communication Pathways in Inflammation-Associated Sickness and Depression. In: **Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications**. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2016. p. 73–94.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2017.

DE ASSIS, P. M. *et al.* In silico, in vitro and in vivo studies indicate resveratrol analogue as a potential alternative for neuroinflammatory disorders. **Life Sciences**, v. 249, p. 117538–117552, 2020.

DE GUGLIELMO, G. *et al.* Pioglitazone attenuates the opioid withdrawal and vulnerability to relapse to heroin seeking in rodents. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 2, p. 223–234, 2017.

DE LUCA, M. A. *et al.* Stimulation of in vivo dopamine transmission and intravenous self-administration in rats and mice by JWH-018, a Spice cannabinoid. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 705–714, 2015.

DERELI, F. T. G.; ILHAN, M.; AKKOL, E. K. New Drug Discovery from Medicinal Plants and Phytoconstituents for Depressive Disorders. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 18, n. 2, p. 92–102, 2018.

DI BARI, M. *et al.* Cholinergic System and Neuroinflammation: Implication in Multiple Sclerosis. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 109–115, 2017.

DO NASCIMENTO, R. F. *et al.* Rosmarinic acid prevents gastric ulcers via sulfhydryl groups reinforcement, antioxidant and immunomodulatory effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 12, p. 2265–2278, 2020.

DOMI, E. *et al.* Genetic deletion of neuronal PPAR γ enhances the emotional response to acute stress and exacerbates anxiety: An effect reversed by rescue of amygdala PPAR γ function. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 50, p. 12611–12623, 2016.

DONG, B. *et al.* Dual pharmacological inhibitor of endocannabinoid degrading enzymes

reduces depressive-like behavior in female rats. **Journal of Psychiatric Research**, v. 120, p. 103–112, 2020.

DOOLEY, L. N. *et al.* The role of inflammation in core features of depression: Insights from paradigms using exogenously-induced inflammation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 94, p. 219–237, 2018.

DU SERT, N. P. *et al.* The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 18, n. 7, p. 1–12, 2020.

EGERTOVÁ, M.; CRAVATT, B. F.; ELPHICK, M. R. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB1 cannabinoid receptor expression in the mouse brain: Evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. **Neuroscience**, v. 119, n. 2, p. 481–496, 2003.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

ELUFIOYE, T. O.; HABTEMARIAM, S. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108600–108611, 2019.

FACHEL, F. N. S. *et al.* An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders. **Neurochemistry International**, v. 122, p. 47–58, 2019.

FAKHFOURI, G. *et al.* WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR- γ pathway. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 653–666, 2012.

FATHINEZHAD, Z. *et al.* Depression and Treatment with Effective Herbs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 6, p. 738–745, 2019.

FERLEMI, A. V. *et al.* Rosemary tea consumption results to anxiolytic- and anti-depressant-like behavior of adult male mice and inhibits all cerebral area and liver cholinesterase activity; Phytochemical investigation and in silico studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 237, p. 47–57, 2015.

FERRARI, F.; VILLA, R. F. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 4847–4865, 2016.

FRANKLIN, J. M.; CARRASCO, G. A. Cannabinoid receptor agonists upregulate and enhance serotonin 2A (5-HT_{2A}) receptor activity via ERK1/2 signaling. **Synapse**, v. 67, n. 3, p. 145–159, 2013.

FRITZ, A. K.; AMREIN, I.; WOLFER, D. P. Similar reliability and equivalent performance of female and male mice in the open field and water-maze place navigation task. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 175, n. 3, p. 380–391, 2017.

GÁLL, Z. *et al.* Effects of chronic cannabidiol treatment in the rat chronic unpredictable mild stress model of depression. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 1–16, 2020.

GALTS, C. P. C. *et al.* Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 56–84, 2019.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964.

GARCÍA-MARTÍN, A. *et al.* Cannabinoid derivatives acting as dual PPAR γ /CB2 agonists as therapeutic agents for systemic sclerosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 163, p. 321–334, 2019.

GHASEMZADEH RAHBARDAR, M. *et al.* Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 441–449, 2017.

GHASEMZADEH RAHBARDAR, M.; HOSSEINZADEH, H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 10, p. 1779–1795, 2020.

GHAZIZADEH, J. *et al.* *Melissa officinalis* L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 4, p. 707–720, 2020.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 1999.

GONÇALVES, E. C. D. *et al.* Terpenoids, cannabimimetic ligands, beyond the cannabis plant. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1–47, 2020a.

GONÇALVES, E. C. D. *et al.* Citral Inhibits the Inflammatory Response and Hyperalgesia in Mice: The Role of TLR4, TLR2/Dectin-1, and CB2 Cannabinoid Receptor/ATP-Sensitive K⁺ Channel Pathways. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 83, n. 4, p. 1190–1200, 2020b.

GONÇALVES, E. D.; DUTRA, R. C. Cannabinoid receptors as therapeutic targets for autoimmune diseases: where do we stand? **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 9, p. 1845–1853, 2019.

GONDA, X. *et al.* Novel antidepressant drugs : Beyond monoamine targets. p. 1–10, 2021.

GONG, J. P. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.

GRAHEK, I. *et al.* Motivation and cognitive control in depression. **bioRxiv**, v. 32, n. 0, p.

371–381, 2019.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020.

HAJ-MIRZAIAN, A. *et al.* Activation of cannabinoid receptors elicits antidepressant-like effects in a mouse model of social isolation stress. **Brain Research Bulletin**, v. 130, p. 200–210, 2017.

HALARIS, A.; SOHL, E.; WHITHAM, E. A. Treatment-resistant depression revisited: A glimmer of hope. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 2, p. 1–28, 2021.

HALDER, N.; LAL, G. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 660342–660371, 2021.

HALLER, H. *et al.* Complementary therapies for clinical depression: An overview of systematic reviews. **BMJ Open**, v. 9, n. 8, p. 1–15, 2019.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 54–63, 2013.

HAN, J. *et al.* Rosmarinic acid protects against inflammation and cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia/reperfusion injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1–11, 2017.

HAN, Y. *et al.* Rosmarinic inhibits cell proliferation, invasion and migration via up-regulating miR-506 and suppressing MMP2/16 expression in pancreatic cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 115, p. 108878, 2019.

HÄRING, M. *et al.* Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. **Neuroscience**, v. 146, n. 3, p. 1212–1219, 2007.

HARUNA, T. *et al.* The Inhibitory Effect of S-777469, a Cannabinoid Type 2 Receptor Agonist, on Skin Inflammation in Mice. **Pharmacology**, v. 99, n. 5–6, p. 259–267, 2017.

HASE, T. *et al.* Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

HASSANZADEH, P.; HASSANZADEH, A. The CB 1 receptor-mediated endocannabinoid signaling and NGF: The novel targets of curcumin. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 5, p. 1112–1120, 2012.

HILL, M. *et al.* Serum Endocannabinoid Content is Altered in Females with Depressive Disorders: A Preliminary Report. **Pharmacopsychiatry**, v. 41, n. 2, p. 48–53, 2008.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 593–599, 2005.

- HILLARD, C.; LIU, Q. Endocannabinoid Signaling in the Etiology and Treatment of Major Depressive Illness. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 23, p. 3795–3811, 2014.
- HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1–21, 2015.
- HODES, G. E. *et al.* Neuroimmune mechanisms of depression. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1386–1393, 2015.
- HOWES, O. D.; THASE, M. E.; PILLINGER, T. Treatment resistance in psychiatry: state of the art and new directions. **Molecular Psychiatry**, n. May, p. 1–15, 2021.
- HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E. CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology. In: **Cannabinoid Pharmacology**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 169–206.
- HUANG, N. *et al.* Contribution of skeletal muscular glycine to rapid antidepressant effects of ketamine in an inflammation-induced mouse model of depression. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 12, p. 3513–3523, 2019.
- HUSSAIN, T. *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- IANNOTTI, F. A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. **Progress in Lipid Research**, v. 62, p. 107–128, 2016.
- IBARRA-LECUE, I. *et al.* The endocannabinoid system in mental disorders: Evidence from human brain studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, p. 97–107, 2018.
- ISTIFLI, E. S. Chemical Composition, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Onosma bourgaei* and *Onosma trachytricha* and in Silico Molecular Docking Analysis of Dominant Compounds. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 2981, 2021.
- ITO, N. *et al.* Rosmarinic acid from perillae herba produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1376–1380, 2008.
- JANG, A. H. *et al.* Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1271–1277, 2011.
- JEON, S. W.; KIM, Y. K. Inflammation-induced depression: Its pathophysiology and therapeutic implications. **Journal of Neuroimmunology**, v. 313, p. 92–98, 2017.
- JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v. 341, p. 79–90, 2018.

- JIANG, K. *et al.* Anti-inflammatory Effects of Rosmarinic Acid in Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Mice. **Inflammation**, v. 41, n. 2, p. 437–448, 2018.
- JIANG, W. L. *et al.* Rosmarinic acid protects against experimental sepsis by inhibiting proinflammatory factor release and ameliorating hemodynamics. **Shock**, v. 32, n. 6, p. 608–613, 2009.
- JIN, X. *et al.* Rosmarinic acid ameliorates depressive-like behaviors in a rat model of CUS and up-regulates BDNF levels in the hippocampus and hippocampal-derived astrocytes. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 9, p. 1828–1837, 2013.
- JIN, Y. *et al.* Mechanisms of Panax ginseng action as an antidepressant. **Cell Proliferation**, v. 52, n. 6, p. 1–15, 2019.
- JORDAN, C. J.; XI, Z.-X. Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 98, p. 208–220, 2019.
- JUNG, T. *et al.* Functional interactions between cannabinoids, omega-3 fatty acids, and peroxisome proliferator-activated receptors: Implications for mental health pharmacotherapies. **European Journal of Neuroscience**, p. 1–13, 2020.
- KALB, A. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors Reduce Neuroinflammation and - Degeneration in the Cortex and Hippocampus of a Surgery Stress Rat Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–13, 2013.
- KATZMAN, M. A.; FURTADO, M.; ANAND, L. Targeting the Endocannabinoid System in Psychiatric Illness. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 691–703, 2016.
- KENNEDY, S. H. *et al.* Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 clinical guidelines for the management of adults with major depressive disorder: Section 3. Pharmacological Treatments. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 61, n. 9, p. 540–560, 2016.
- KHAMSE, S. *et al.* The effect of rosmarinic acid on apoptosis and nNOS immunoreactivity following intrahippocampal kainic acid injections in rats. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 41–48, 2020.
- KIECKER, C. The origins of the circumventricular organs. **Journal of Anatomy**, v. 232, n. 4, p. 540–553, 2018.
- KIESER, K. J.; KAGAN, J. C. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 376–390, 2017.
- KILARU, A.; CHAPMA, K. D. The endocannabinoid system. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 485–499, 2020.
- KLEIN, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.
- KÖHLER, C. A. *et al.* Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-

analysis of 82 studies. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 135, n. 5, p. 373–387, 2017.

KONDO, S. *et al.* Antidepressant-like effects of rosmarinic acid through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and brain-derived neurotrophic factor modulation. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 758–766, 2015.

KRAUS, C. *et al.* Prognosis and improved outcomes in major depression: a review. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, 2019.

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

KUMAR, A. *et al.* Cannabimimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators? **Planta**, v. 249, n. 6, p. 1681–1694, 2019.

KUTZER, T. *et al.* Antidepressant efficacy and side effect burden: An updated guide for clinicians. **Drugs in Context**, v. 9, p. 1–11, 2020.

LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: A practical primer for t-tests and ANOVAs. **Frontiers in Psychology**, v. 4, p. 1–12, 2013.

LE BOISSELIER, R. *et al.* Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 101, n. 2, p. 220–229, 2017.

LI, Y. F. A hypothesis of monoamine (5-HT) – Glutamate/GABA long neural circuit: Aiming for fast-onset antidepressant discovery. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 208, p. 107494–107504, 2020.

LIAO, L. *et al.* Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, modulates NF- κ B/IL-6/STAT3, CREB/BDNF pathways and central serotonergic neurotransmission in mice. **International Immunopharmacology**, v. 49, p. 178–186, 2017.

LIEBERKNECHT, V. *et al.* Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 365–373, 2017.

LIMA-OJEDA, J. M.; RUPPRECHT, R.; BAGHAI, T. C. Neurobiology of depression: A neurodevelopmental approach. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 19, n. 5, p. 349–359, 2018.

LIN, J. *et al.* Trans-cinnamaldehyde shows anti-depression effect in the forced swimming test and possible involvement of the endocannabinoid system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 518, n. 2, p. 351–356, 2019.

LIN, S. H. *et al.* A medicinal herb, *Melissa officinalis* L. ameliorates depressive-like behavior of rats in the forced swimming test via regulating the serotonergic neurotransmitter. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 266–272, 2015.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, 2012.

- LIU, Q. R. *et al.* Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2017.
- LIU, Y. *et al.* Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 112, p. 1–15, 2018.
- LIU, Y. *et al.* Dysfunction in serotonergic and noradrenergic systems and somatic symptoms in psychiatric disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, p. 1–8, 2019.
- LU, H.-C.; MACKIE, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 516–525, 2016.
- LUFT, J. G. *et al.* Rosmarinic acid improves oxidative stress parameters and mitochondrial respiratory chain activity following 4-aminopyridine and picrotoxin-induced seizure in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, n. 11, p. 1347–1358, 2019.
- LUO, C. *et al.* A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1–11, 2020.
- LV, R. *et al.* Rosmarinic acid attenuates inflammatory responses through inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway in a mouse model of Parkinson's disease. **Life Sciences**, v. 223, p. 158–165, 2019.
- MA, Z. *et al.* Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- κ B pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 397, p. 115014, 2020.
- MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 4, p. 642–650, 2009.
- MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 2, p. 204–211, 2012a.
- MACHADO, D. G. *et al.* *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 158–169, 2012b.
- MALDONADO, R. F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 480–493, 2016.
- MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression. **The Lancet**, v. 392, n. 10161, p. 2299–2312, 2018.
- MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 1, p. 38–54, 2017.

MARTELLI, D.; FARMER, D. G. S.; YAO, S. T. The splanchnic anti-inflammatory pathway: could it be the efferent arm of the inflammatory reflex? **Experimental Physiology**, v. 101, n. 10, p. 1245–1252, 2016.

MARTINS, J.; BRIJESH, S. Phytochemistry and pharmacology of anti-depressant medicinal plants: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 104, p. 343–365, 2018.

MATSUDA, L. A. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.

MESSEHA, S. S. *et al.* Rosmarinic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, p. 173419, 2020.

MICALE, V. *et al.* Role of the Endocannabinoid System in Depression: from Preclinical to Clinical Evidence. In: **Cannabinoid Modulation of Emotion, Memory, and Motivation**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 97–129.

MICALE, V.; DRAGO, F. Endocannabinoid system, stress and HPA axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 230–239, 2018.

MILANDO, R.; FRIEDMAN, A. Cannabinoids: Potential Role in Inflammatory and Neoplastic Skin Diseases. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 167–180, 2019.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22–34, 2016.

MOLLAZADEH, S. *et al.* Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. **Life Sciences**, v. 214, p. 118–123, 2018.

MORA, C. *et al.* Blood biomarkers and treatment response in major depression. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 6, p. 513–529, 2018.

MORETTI, M. *et al.* Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). **Neurotoxicity Research**, v. 28, n. 3, p. 222–231, 2015.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

NADEEM, M. *et al.* Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 15, p. 3139–3162, 2019.

NAIR, A.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NAVARRETE, F. *et al.* Endocannabinoid System Components as Potential Biomarkers in Psychiatry. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 1–30, 2020.

NISHA, C. M. *et al.* Molecular docking and in silico admet study reveals acylguanidine 7a as a potential inhibitor of β -secretase. **Advances in Bioinformatics**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

O’SULLIVAN, S. E. An update on PPAR activation by cannabinoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 12, p. 1899–1910, 2016.

OLIVEIRA, C. DA C. *et al.* Evidence for the involvement of opioid and cannabinoid systems in the peripheral antinociception mediated by resveratrol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 369, p. 30–38, 2019.

ORSOLINI, L. *et al.* Use of medicinal cannabis and synthetic cannabinoids in post-traumatic stress disorder (PTSD): A systematic review. **Medicina (Lithuania)**, v. 55, n. 9, 2019.

OTTE, C. *et al.* Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–21, 2016.

OZAROWSKI, M. *et al.* Rosmarinus officinalis L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. **Fitoterapia**, v. 91, p. 261–271, 2013.

PARK, B. S.; LEE, J. O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 45, n. 12, p. 1–9, 2013.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex - Linking immunity and metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 743–754, 2012.

PAYANDEMEHR, B. *et al.* Involvement of PPAR receptors in the anticonvulsant effects of a cannabinoid agonist, WIN 55,212-2. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 57, p. 140–145, 2015.

PAZINI, F. L.; CUNHA, M. P.; RODRIGUES, A. L. S. The possible beneficial effects of creatine for the management of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 89, p. 193–206, 2019.

PISTIS, M. *et al.* Δ^9 -Tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: An in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 948, n. 1–2, p. 155–158, 2002.

PITSILLOU, E. *et al.* The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 1, p. 753–770, 2019.

POHANKA, M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 9809–9825, 2014.

POLESZAK, E. *et al.* Cannabinoids in depressive disorders. **Life Sciences**, v. 213, n. July, p. 18–24, 2018.

POLESZAK, E. *et al.* Influence of the CB1 cannabinoid receptors on the activity of the

monoaminergic system in the behavioural tests in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 150, p. 179–185, 2019.

POLESZAK, E. *et al.* Ligands of the CB2 cannabinoid receptors augment activity of the conventional antidepressant drugs in the behavioural tests in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 378, p. 112297–112306, 2020.

POROIKOV, V. V. *et al.* Computer-aided prediction of biological activity spectra for organic compounds: the possibilities and limitations. **Russian Chemical Bulletin**, v. 68, n. 12, p. 2143–2154, 2019.

PRASHANTHA KUMAR, B. R. *et al.* Minutes of PPAR- γ agonism and neuroprotection. **Neurochemistry International**, v. 140, p. 104814–104823, 2020.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 1, p. 61–71, 2012.

PROSPÉRO-GARCÍA, O. *et al.* Endocannabinoids as Therapeutic Targets. **Archives of Medical Research**, v. 50, n. 8, p. 518–526, 2019.

QIN, X. *et al.* PPAR γ -mediated microglial activation phenotype is involved in depressive-like behaviors and neuroinflammation in stressed C57BL/6J and ob/ob mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 117, p. 104674–104685, 2020.

RAHMAN, S.; ALZAREA, S. Glial mechanisms underlying major depressive disorder: Potential therapeutic opportunities. In: **Molecular Basis of Neuropsychiatric Disorders: from Bench to Bedside**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 167, p. 159–178.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2007.

REN, S. YU *et al.* Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases—focusing on FAAH/MAGL inhibitors. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 10, p. 1263–1271, 2020.

SADAGHIANI, M. S. *et al.* Antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice: The role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. **Behavioural Brain Research**, v. 224, n. 2, p. 336–343, 2011.

SADEGHI, A. *et al.* The effects of rosmarinic acid on oxidative stress parameters and inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced peripheral blood mononuclear cells. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 3557–3566, 2020.

SAHU, P. *et al.* Cannabinoid receptor 2 activation mitigates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 6, p. 1829–1838, 2019.

SANTANA, K. *et al.* Applications of Virtual Screening in Bioprospecting: Facts, Shifts, and Perspectives to Explore the Chemo-Structural Diversity of Natural Products. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 662688–662711, 2021.

- SANTARSIERI, D.; SCHWARTZ, T. L. Antidepressant efficacy and side-effect burden: A quick guide for clinicians. **Drugs in Context**, v. 4, p. 1–12, 2015.
- SASAKI, K. *et al.* Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 238, n. 1, p. 86–94, 2013.
- SCHMITZ, J. M. *et al.* PPAR-gamma agonist pioglitazone modifies craving intensity and brain white matter integrity in patients with primary cocaine use disorder: a double-blind randomized controlled pilot trial. **Addiction**, v. 112, n. 10, p. 1861–1868, 2017.
- SCUDERI, C.; STEARDO, L.; ESPOSITO, G. Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in SHSY5YAPP+ cells through PPAR γ involvement. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 7, p. 1007–1013, 2014.
- SEPANJNIA, K. *et al.* Pioglitazone adjunctive therapy for moderate-to-severe major depressive disorder: Randomized double-blind placebo-controlled trial. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2093–2100, 2012.
- SHANG, A. J. *et al.* Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 172–179, 2016.
- SHAO, X.; ZHU, G. Associations Among Monoamine Neurotransmitter Pathways, Personality Traits, and Major Depressive Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 1–19, 2020.
- SHARIQ, A. S. *et al.* Therapeutic potential of JAK/STAT pathway modulation in mood disorders. **Reviews in the Neurosciences**, v. 30, n. 1, p. 1–7, 2019.
- SHARKEY, K. A.; WILEY, J. W. The Role of the Endocannabinoid System in the Brain–Gut Axis. **Gastroenterology**, v. 151, n. 2, p. 252–266, 2016.
- SHEEHAN, D. V. *et al.* Restoring function in major depressive disorder: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 215, p. 299–313, 2017.
- SMAGA, I. *et al.* Changes in the cannabinoids receptors in rats following treatment with antidepressants. **NeuroToxicology**, v. 63, p. 13–20, 2017.
- SOTNIKOVA, R. *et al.* Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 713–723, 2013.
- SREEJAYAN, N.; RAO, M. N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittel-Forschung**, v. 46, n. 2, p. 169–71, 1996.
- SZEITZ, A.; BANDIERA, S. M. Analysis and measurement of serotonin. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 1, p. 1–16, 2018.
- TACCHINI, M. *et al.* Ocimum campechianum Mill. from Amazonian Ecuador: Chemical

Composition and Biological Activities of Extracts and Their Main Constituents (Eugenol and Rosmarinic Acid). **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 84, 2020.

TACEY, A. *et al.* Undercarboxylated osteocalcin has no adverse effect on endothelial function in rabbit aorta or human vascular cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 4, p. 2840–2849, 2020.

TAKEDA, H. *et al.* Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 449, n. 3, p. 261–267, 2002.

TANAKA, S. *et al.* Neuroimmunomodulation of tissue injury and disease: an expanding view of the inflammatory reflex pathway. **Bioelectronic Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2019.

TOCZEK, M.; MALINOWSKA, B. Enhanced endocannabinoid tone as a potential target of pharmacotherapy. **Life Sciences**, v. 204, p. 20–45, 2018.

TOMAR, V. *et al.* Small molecule drug design. **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics**, v. 1–3, p. 741–760, 2018.

TRUSLER, A. R. *et al.* The Endocannabinoid System and Its Role in Eczematous Dermatoses. **Dermatitis**, v. 28, n. 1, p. 22–32, 2017.

TUFANO, M.; PINNA, G. Is There a Future for PPARs in the Treatment of Neuropsychiatric Disorders? **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1062, 27 fev. 2020.

UNITED NATIONS. **Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)**. 7. ed. New York and Geneva: United Nations, 2017.

VAFADARI, B.; SALAMIAN, A.; KACZMAREK, L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 91–114, 2016.

VAKNINE, S.; SOREQ, H. Central and peripheral anti-inflammatory effects of acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 168, p. 108020–108028, 2020.

VAN SICKLE, M. D. *et al.* Neuroscience: Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 329–332, 2005.

VAVÁKOVÁ, M.; ůURAČKOVÁ, Z.; TREBATICKÁ, J. Markers of Oxidative Stress and Neuroprogression in Depression Disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 898393–898405, 2015.

VERHEGGEN, I. C. M. *et al.* Permeability of the windows of the brain: feasibility of dynamic contrast-enhanced MRI of the circumventricular organs. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2020.

VIEIRA, G. *et al.* Antidepressant-like effect of terpineol in an inflammatory model of depression: Involvement of the cannabinoid system and D2 dopamine receptor. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 1–23, 2020.

- VILLAPOL, S. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 121–132, 2018.
- VILLAS BOAS, G. R. *et al.* Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 851, p. 99–121, 2019.
- VINUTHA, B. *et al.* Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359–363, 2007.
- WANG, L. *et al.* Rosmarinic acid inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells SMMC 7721 via PI3K/AKT/mTOR signal pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 120, n. 1, p. 109443, 2019.
- WEI, Y. *et al.* Rosmarinic Acid Mitigates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammatory Responses through the Inhibition of TLR4 and CD14 Expression and NF- κ B and NLRP3 Inflammasome Activation. **Inflammation**, v. 41, n. 2, p. 732–740, 2018.
- WEI, Y. *et al.* Rosmarinic Acid Regulates Microglial M1/M2 Polarization via the PDPK1/Akt/HIF Pathway Under Conditions of Neuroinflammation. **Inflammation**, v. 44, n. 1, p. 129–147, 2020.
- WOELFER, M. *et al.* The Role of Depressive Subtypes within the Neuroinflammation Hypothesis of Major Depressive Disorder. **Neuroscience**, v. 403, p. 93–110, 2019.
- WOHLEB, E. S. *et al.* Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 497–511, 2016.
- WOODHAMS, S. G. *et al.* The Role of the Endocannabinoid System in Pain. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l: s.n.]. p. 119–143.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>. Acesso em: 29 mar. 2021.
- YAHFOUFI, N. *et al.* The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–23, 2018.
- YANG, H. *et al.* AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067–1069, 2019.
- YAO, W. *et al.* Antidepressant effects of TBE-31 and MCE-1, the novel Nrf2 activators, in an inflammation model of depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 793, p. 21–27, 2016.
- YE, L. *et al.* New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. **Current Molecular Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 239–248, 2019.
- YEUNG, K. S. *et al.* Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 5, p.

865–891, 2018.

YOSHIDA, T. *et al.* Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 12–14, 2012.

YOUSSEF, D. A.; EL-FAYOUMI, H. M.; MAHMOUD, M. F. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, p. 145–154, 2019.

ZHANG, B. *et al.* Antidepressant-like effect and mechanism of action of honokiol on the mouse lipopolysaccharide (LPS) depression model. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1–17, 2019.

ZHANG, M. *et al.* Rosmarinic acid protects rat hippocampal neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury via the Akt/JNK3/caspase-3 signaling pathway. **Brain Research**, v. 1657, p. 9–15, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Rosmarinic acid attenuates cardiac fibrosis following long-term pressure overload via AMPK α /Smad3 signaling article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.

ZHAO, Q. *et al.* The antidepressant-like effects of pioglitazone in a chronic mild stress mouse model are associated with PPAR γ -mediated alteration of microglial activation phenotypes. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2016.

ZHAO, X. *et al.* Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 494–502, 2019.

ZONG, J. *et al.* The antidepressant effects of rosiglitazone on rats with depression induced by neuropathic pain. **Life Sciences**, v. 203, p. 315–322, 2018.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 833–856, 2018.