



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**BEATRIZ MARIA RIBEIRO**

**POTENCIAL DO CMS121, UM DERIVADO DE FLAVONOIDE  
FISSETINA, COMO AGENTE NEUROPROTETOR**

**FLORIANÓPOLIS**

**2023**

BEATRIZ MARIA RIBEIRO

**POTENCIAL DO CMS121, UM DERIVADO DE FLAVONOIDE  
FISSETINA, COMO AGENTE NEUROPROTETOR**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré  
Coorientadora: Mestra Jéssica Jorge Probst

FLORIANÓPOLIS

2023

Ribeiro, Beatriz Maria

POTENCIAL DO CMS121, UM DERIVADO DE FLAVONOIDE Fisetina, COMO AGENTE NEUROPROTETOR /Beatriz Maria Ribeiro ; orientador, Alcir Luiz Dafré, coorientadora, Jéssica Jorge Probst, 2023.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. CMS121. 3. Sepse. 4. Neuroproteção. 5. Comportamento do tipo-ansioso e do tipo-depressivo. I. Dafré, Alcir Luiz. II. Probst, Jéssica Jorge. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Beatriz Maria Ribeiro

**POTENCIAL DO CMS121, UM DERIVADO DE FLAVONOIDE Fisetina,  
COMO AGENTE NEUROPROTETOR**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de bacharela e aprovado em sua forma final pelo Curso Ciências Biológicas.

Local Florianópolis, 30 de novembro de 2023

[Empty dotted box for signature]

---

Coordenação do Curso

**Banca examinadora**

[Empty dotted box for signature]

---

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré  
Orientador(a)

[Empty dotted box for signature]

Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller  
Instituição UFSC

[Empty dotted box for signature]

Dra. Kelly Cattelan Bonorino

Florianópolis, 2023

Este trabalho é dedicado aos meus pais, irmã e amigos, que sempre estiverem lá quando eu precisei.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por permitir que eu acorde todos os dias, por ter me dado a oportunidade de estudar algo tão lindo como a biologia, ter cuidado de mim, me acalmado e por ter me inspirado por todos esses anos, mostrando a beleza da sua criação em cada célula que eu já observei no microscópio.

Gostaria de agradecer meus pais, Goreti e Renato, por também terem cuidado de mim durante toda a minha vida, nunca me deixando pensar que eu não era capaz de fazer algo. Gostaria de agradecer minha irmã Bruna pelo companheirismo desde pequena, nunca me deixando fazer algo idiota sozinha, e ao Guilherme, por cuidar da Bruna por mim. Quero agradecer a Larissa, minha melhor amiga, que me conhece mais do que qualquer pessoa, que me apoia em todas as minhas decisões e que não me deixa passar sozinha pelas minhas crises de ansiedade. Agradeço a Lavinia e ao João pelas noites de jogos que me permitiram uma merecida distração ao estresse do TCC. Agradeço aos meus pastores, Marta, Joelson e Carol por sempre estarem disponíveis em meus tempos de crise, e todos os meus amigos e colegas da igreja que ocuparam todos os meus finais de semanas, mas nunca fizeram eu me arrepender disso.

Ainda quero agradecer a Leticia e Beatriz que me fizeram companhia nesses anos de biologia, que sempre estiveram disponíveis para que eu possa reclamar de uma matéria, de um professor ou de algum outro aluno.

Quero agradecer imensamente o meu orientador Alcir, que me guiou durante esse processo do TCC, e a minha coorientadora Jessica que esteve lá em todas as etapas da minha pesquisa, que teve a paciência de me ensinar tudo que não entendia e que me serviu como inspiração de pesquisadora e mulher. Agradeço as minhas colegas de laboratório, Gisele, Heloísa, Larissa e Karine por me receberem nesse período. Gostaria de agradecer ao Laboratório de Defesas Celulares (LABDEF), a Universidade Federal de Santa Catarina e aos meus professores durante esses anos de graduação por me ajudarem a me apaixonar pela biologia.

Agradeço a doutora Pamela Maher e ao doutro Jamil Assreuy pela gentileza de doarem materiais que foram usados nesse trabalho. Quero agradecer ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), a CAPES, ao CNPq pela bolsa IC e o financiamento recebido período, e ao Laboratório Multiusuário de Estudos em

Biologia (LAMEB) e ao Departamento de Bioquímica por deixarem que nos usássemos de suas dependências e equipamentos.

Por último, gostaria de agradecer aos camundongos que foram utilizados nessa pesquisa, e a todos os animais que dão a sua vida para que a ciência continue progredindo.

Muito obrigada!

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less” – Marie Curie*



## RESUMO

O CMS121 é um derivado do flavonol fisetina que tem apresentado efeitos anti-inflamatórios e de neuroproteção, além de ser candidato a medicamento para o tratamento da doença de Alzheimer. O flavonol fisetina, possui propriedades anti-inflamatórias, ansiolíticas e antidepressivas. A sepse é uma doença sistêmica, sendo uma das causas mais comuns de morte em hospitais. A presença dos transtornos de ansiedade e depressão em sobreviventes da sepse é muito comum, onde os danos neurais são similares àqueles presentes na doença de Alzheimer. O presente trabalho busca observar os potenciais benefícios comportamentais do tratamento com CMS121 em camundongos saudáveis e na recuperação de camundongos submetidos à dois modelos de sepse experimental. O projeto foi dividido em três etapas onde a eficácia do tratamento com CMS121 foi medido por meio de testes comportamentais, mortalidade, escore clínico, perda de peso, consumo de água e ração. O tratamento por 7 dias com CMS121 não apresentou efeito ansiolítico ou antidepressivo em animais saudáveis nos testes de suspensão pela cauda, labirinto de cruz elevada, borrifagem de sacarose e campo aberto nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg do animal, feito por injeção intraperitoneal (*i.p.*). Na sepse pulmonar induzida por *Klebsiella pneumoniae* (*K.p.*) houve cerca de 40% de mortalidade e perda de até 10 gramas do peso do animal. O CMS121 administrado em dose única de 3 ou 10 mg/kg, feito por injeção *i.p.* não foi capaz de influenciar na mortalidade e nem na recuperação do animal, visto a partir do escore clínico e da variação do peso. Entretanto, o CMS121 reduziu o consumo acumulado de ração nas duas doses testadas. Na terceira etapa, os animais foram expostos a uma injeção *i.p.* de lipopolissacarídeo (LPS) e foram tratados por CMS121 em doses diárias de 30 mg/kg, por meio de ingestão voluntária. O tratamento iniciou 3 dias antes da injeção do LPS e se estendeu até 7 dias depois. O índice de saúde piorou (escore clínico) após a injeção de LPS, bem como diminuiu o consumo de água e ração. O LPS também diminuiu a mobilidade no campo aberto, quando analisado 24 horas após a injeção. Observou-se aumento da mobilidade no campo aberto realizado 7 dias após a exposição ao LPS. O CMS121 promoveu a recuperação do peso dos animais, enquanto os animais expostos ao LPS permaneceram com peso abaixo do nível dos animais controle. No comportamento do campo aberto realizado 24 horas após a injeção de LPS, o CMS121 aumentou o tempo de permanência no centro, porém não influenciou os demais comportamentos. Os resultados do estudo mostram que, nas doses e condições estudadas, o CMS121 não apresentou efeito ansiolítico e antidepressivo nos animais saudáveis, e foi ineficaz nos modelos de sepse induzida pela bactéria *K.p.* ou pelo LPS.

Os benefícios do CMS121 ainda podem ser testados utilizando em doses e testes comportamentais diferentes, ou ainda com modelos diferentes de infecções agudas e crônicas.

**Palavras-chave:** CMS121, sepse, neuroproteção, comportamento do tipo-ansioso, e comportamento do tipo-depressivo.

## ABSTRACT

CMS121 is a molecule derivative of the flavonoid fisetin that has shown anti-inflammatory and neuroprotection properties, and it is a candidate for medication for Alzheimer's disease. The flavonoid fisetin has anti-inflammatory, anxiolytic and anti-depressive properties. Sepsis is a systemic disease, being one of the leading causes of death in hospitals. The presence of anxiety and depression disorder in survivors of sepsis is very common, where the neurological damages are very similar to the ones present in Alzheimer's disease. This work seeks to observe the potential benefits in the behavior with the treatment of CMS121 in healthy mice and see the CMS121 effects in the recovery of mice under two models of experimental sepsis. The project was split in three steps where the efficiency of the CMS121 treatment was measured with behavioral tests, mortality, clinical score, weight loss, water and food intake. The seven days treatment with CMS121 didn't show anxiolytic and anti-depressive properties in healthy mice in the behavioral tests of tail suspension, elevated plus maze, splash and open field, in the doses tested 1, 3 and 10 mg/kg of the animal, done by intraperitoneal injection. In the bacterial sepsis by *Klebsiella pneumoniae* (*K.p.*), there were a 40% mortality and about 10 grams of weight loss per animal. The CMS121 administered in a single dose of 3 or 10 mg/kg, done by intraperitoneal injection, weren't capable to affect the mortality and the recovery of the animals, seen by the clinical score and the weight loss. Nonetheless, the CMS121 reduced the cumulative food intake in the two doses tested. In the third step, the animals were exposed to an injection of Lipopolysaccharide (LPS) and were treated with CMS121 in daily doses of 30 mg/kg by voluntary intake. The treatment started 3 days before in LPS injection and extended until 7 days after the LPS. The health (clinical score) of the animals got worst after the injection of LPS, and the injection also lowered the water and food intake. The LPS also lowered the mobility in the open field done 24 hours after in LPS injection. The mobility was increased in the open field done 7 days after the LPS. The CMS121 promoted the recovery of the weight of the animals, while the animals exposed to the LPS remained with lower weight than the control group. During the open field done 24 hours after the LPS injection, the CMS121 increased the time at the center of the open field, but it didn't influence any other behavior. The result of this study shows that, in the conditions tested, the CMS121 doesn't have anxiolytic and anti-depressive in healthy animals, and the CMS121 is inefficient in the recovery in cases of severe infections like sepsis induced by bacteria *K.p.* and by LPS. The benefits of

CMS121 still can be tested by using different doses and behavioral tests, or still by using different models of acute and chronic diseases.

**Keywords:** CMS121, sepsis, neuroprotection, anxiety-like behavior, and depressive-like behavior.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental da primeira etapa .....	26
Figura 2 – Desenho experimental da segunda etapa.....	28
Figura 3- Desenho experimental da terceira etapa .....	29
Figura 4 – Esquema do aparato utilizado no teste de TSC .....	30
Figura 5 – Esquema do aparato utilizado no TBS .....	31
Figura 6 – Esquema do aparato utilizado no teste LCE .....	32
Figura 7 – Esquema para o aparato utilizado no CA.....	33
Figura 8 – Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no comportamento no CA .....	36
Figura 9 – Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no comportamento no TSC.....	37
Figura 10 – Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no teste BS .	38
Figura 11 - Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no LCE.....	39
Figura 12 – Efeitos do CMS121 sobre a mortalidade, escore clínico, peso, consumo de água e ração em animais sépticos .....	40
Figura 13 – Efeitos do CMS121 sobre escore clínico, peso, consumo de água e ração em animais expostos ao LPS .....	42
Figura 14 – Efeitos do CMS121 sobre o comportamento no CA de animais submetidos ao modelo de LPS, avaliados 24 horas após a exposição .....	43
Figura 15 - Efeitos do CMS121 sobre o comportamento no CA de animais submetidos ao modelo de LPS, avaliados 7 dias após a exposição .....	45
Figura 16 – Efeitos do CMS121 sobre o comportamento no TSC de animais submetidos ao modelo de LPS, avaliados 7 dias após a exposição .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CA	Campo aberto
CTL	Controle
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
i.p.	Intraperivoneal
K.p.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LCE	Labirinto de cruz elevada
LPS	Lipopolissacarídeo
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PS	Pneumoséptico
TBS	Teste de borrigafem de sacarose
TSC	Teste suspensão pela cauda
UTI	Unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 CMS121 .....	15
1.2 COMPORTAMENTO ANIMAL .....	16
1.3 ANSIEDADE E DEPRESSÃO .....	19
1.4 SEPSE .....	21
<b>2. JUSTIFICATIVA E HIPOTESE</b> .....	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	24
<b>4. MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 ANIMAIS .....	25
4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	25
<b>4.2.1 Efeitos do CMS121 sobre o comportamento do tipo ansioso e do tipo depressivo em animais saudáveis</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2.2 Efeitos do tratamento com CMS121 em um modelo de sepse com bactéria <i>K.p.</i></b> .....	<b>27</b>
<b>4.2.3 Potencial efeito protetor do CMS121 em animais expostos ao LPS</b> .....	<b>28</b>
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	29
<b>4.3.1 Teste de suspensão pela cauda</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3.2 Teste de borrifagem de sacarose</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3.3 Teste de labirinto de cruz elevada</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3.4 Campo aberto</b> .....	<b>32</b>
4.4 ESCORE CLÍNICO .....	33
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	34
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
5.1 EFEITOS DOS CMS121 SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO E DO TIPO DEPRESSIVO EM ANIMAIS SAUDAVEIS .....	35
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM CMS121 EM UM MODELO DE SEPSE COM BACTERIA <i>K.p.</i> .....	39
5.3 POTENCIAL EFEITO PROTEOR DO CMS121 EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS .....	41
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b>9. ANEXO</b> .....	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CMS121

O CMS121 é uma pequena molécula aprimorada a partir do flavonoide fisetina, escolhida com base em um levantamento com vários testes *in vitro* (CHIRUTA *et al.*, 2012; PRIOR *et al.*, 2014) e, posteriormente *in vivo* (ATES *et al.*, 2020, CURRAIS *et al.*, 2019). O flavonoide fisetina é um composto encontrado em muitas plantas, como morangos, maçãs e cebolas (KHAN *et al.*, 2013). A fisetina possui ações anti-inflamatórias, neurotróficas, antioxidantes e é altamente eficaz contra estresse oxidativo, morte celular. A fisetina é capaz de aumentar os níveis de glutathione, gerando neuroproteção contra a toxicidade do glutamato, um modelo clássico de indução de morte celular por oxitose/ferroptose, o qual foi estudado em células neuronais HT22, que são desprovidas de receptores para glutamato (SILVA, 2016; PRIOR *et al.*, 2014).

A molécula de CMS121, que possui todas as propriedades farmacológicas indicadas para drogas que atuam no cérebro, é uma molécula pequena capaz de penetrar nos tecidos do sistema nervoso e é solúvel a solventes apolares como o dimetilsulfóxido (DMSO). A fisetina oferece neuroproteção a partir do aumento dos níveis de acetil-CoA e diminuição de danos em doenças que aparecem com o envelhecimento do organismo (CURRAIS *et al.*, 2019). Em testes *in vitro* o CMS121 confere proteção contra: morte celular caracterizada como oxitose ou ferroptose, inflamação, e isquemia, sendo 400 vezes mais eficiente que a fisetina, e podendo apresentar efeitos agudos (PRIOR *et al.*, 2014; MAHER; CURRAIS; SCHUBERT, 2020).

*In vivo*, o CMS121 teve efeito neuroprotetor em testes cognitivos e bioquímicos em camundongos SAMP8, que apresentam envelhecimento acelerado. O tratamento de quatro meses com o CMS121 conseguiu reverter efeitos metabólicos do envelhecimento acelerado, aumentando os níveis de acetil-CoA, succinato e  $\alpha$ -cetoglutarato. Os aumentos nos níveis da acetil-CoA estão associados a capacidade do CMS121 em aumentar a fosforilação da enzima acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1), enzima responsável pela primeira etapa da síntese de lipídeos. A elevada fosforilação da acetil-CoA carboxilase 1 e altos níveis de acetil-CoA protegeram a célula contra a morte celular regulada, chamada oxitose/ferroptose, além de preservar a expressão de genes mitocondriais no cérebro. As



mudanças na expressão de genes associados ao envelhecimento em animais de 13 meses são revertidas a padrões de animais mais jovens (9 meses) (CURRAIS *et al.*, 2019).

O CMS121 também foi testado em camundongos transgênicos APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 com mutações presente na DA. Ele reduziu a neuroinflamação, a peroxidação de lipídios e a síntese de ácidos graxos insaturados, manifestações comuns na DA (ATES *et al.*, 2020). Mais recentemente o CMS121 foi utilizado para o tratamento de diabetes em um modelo de camundongos obesos (db/db), mostrando potencial geroneurprotetor capaz de ativar a enzima AMPK no cérebro e levando a diminuição da síntese de ácidos graxos. O CMS121 se mostrou capaz de proteger o fígado de marcadores inflamatórios e de marcadores de danos renais (ZAHID *et al.*, 2023). Assim, o CMS 121 é candidato a medicamentos para a DA, com a primeira fase de teste clínico finalizada (PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, 2023).

Um estudo publicado em 2023 mostrou, por meio de testes comportamentais em camundongos, os efeitos ansiolíticos e antidepressivos do composto fisetina, uma molécula flavonoide com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (GOPNAR *et al.*, 2023). Além dos resultados bioquímicos e fisiológicos, o CMS121 também apresenta efeitos no comportamento do animal. Através do teste LCE e CA, foi visto que o CMS121 pode prevenir o comportamento de desinibição resultante do envelhecimento acelerado do camundongo SAMP8 (CURRAIS *et al.*, 2019). No teste LCE e o no labirinto aquático de Morris em camundongos transgênicos APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9, concluiu-se que o CMS121 é capaz de amenizar a perda de memória (ATES *et al.*, 2020).

## 1.2 COMPORTAMENTO ANIMAL

*Mus musculus*, ou como são conhecidos popularmente, os camundongos domésticos, são mamíferos sociáveis de hábitos noturnos. Seus comportamentos típicos incluem a criação de abrigos para a conservação do calor, a manutenção dos seus pelos, também conhecida como *grooming*, interações sociais e exploração do ambiente (DEACON, 2006; ISHII; ITOU; NISHIMURA, 2005; KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2011). O cuidado animal é algo muito importante em trabalhos experimentais, onde a presença de fatores externos pode ter influência. É visto que a presença o estresse sonoro pode levar ao comportamento do tipo-depressivo em camundongos, e até gerar neuroinflamação

(CHENG *et al.*, 2022). Como um modelo animal, variações dos hábitos podem ser correlacionados com doenças ou transtornos em humanos.

O uso de animais em pesquisas tem se tornado essencial para o estudo de diversas doenças, principalmente devido as limitações no estudo em humanos. Roedores, como ratos e camundongos, têm sido usados como modelo alternativo ao humano por causa das suas similaridades em diversos sistemas, como o sistema nervoso central, imunológico, digestório e cardiovascular. Em razão de seu tamanho, ciclo de vida curto, fácil reprodução, fácil manipulação genética, ambientação e comportamento, roedores se tornaram o padrão para testes em mamíferos. Esses animais são usados para a investigação de diversas doenças que acometem o sistema nervoso central, como a ansiedade e depressão. Os transtornos aparecem em forma de sintomas comportamentais que podem ser medidos, mesmo que os roedores não possuam o processo emocional humano, as inferências podem ser feitas, sempre com ressalvas (ACIKGOZ; DALKIRAN; DAYI, 2022; VANHOOREN; LIBERT, 2013).

Uma maneira muito comum de usar o modelo animal é vendo a influência de doenças e do tratamento em seu comportamento. Estudos mostram que diversos fatores podem contribuir para o aumento do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo, como o envelhecimento do animal ou o desenvolvimento de doenças que interferem com o sistema nervoso central, como a DA e infecções (ATES *et al.*, 2020; SHOJI; MIYAKAWA, 2019).

A escolha do teste comportamental é muito importante para a pesquisa que será realizada. Existem diversos tipos de testes de comportamento, muitos deles funcionam expondo o animal em um local novo, ou em uma situação estressante, e observando como ele se comporta. Esses testes buscam avaliar a resposta do animal, e se isso pode ser relacionado ao comportamento do tipo-ansioso ou do tipo-depressivo, por exemplo. Outros testes buscam avaliar a memória do animal, como o teste de reconhecimento do objeto, podendo utilizar estímulos aversivos ou não, ou vendo apenas a natureza de exploração dos roedores (SHIEH; YANG, 2020).

Dentre os testes comportamentais, o campo aberto (CA) foi desenvolvido para avaliar o comportamento animal e sua locomoção. Dele tem-se uma avaliação rápida e fácil do estado do camundongo. O teste consiste em manter o animal em uma caixa por um certo período (5 – 30 minutos) e observar a sua movimentação neste espaço. Esse

comportamento pode então ser contabilizado manualmente ou com a ajuda de um software, rastreando o seu movimento pela caixa. Dentre os resultados, encontram-se o número dos bolos fecais que o roedor produz, a distância percorrida, velocidade e tempo em cada um dos quadrantes da caixa (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). O animal que tende a evitar a área central da caixa pode ser considerado apresentando comportamento do tipo-ansioso, assim como o camundongo que percorre uma menor distância na caixa, e que fica a maior parte do tempo nos cantos. A resposta a algo novo também é associada a exploração e a atividade locomotora, e isso pode ficar comprometido com a repetição do experimento (SHIEH; YANG, 2020).

O teste de suspensão pela cauda (TSC) foi desenvolvido em 1985 e tem como objetivo colocar o animal em uma situação de estresse inescapável. O animal tende a se movimentar para lutar e escapar desta situação. O tempo medido é o de imobilidade, e quanto maior esse tempo, menor foi o tempo que animal passou tentando escapar. Esse é um modelo preditivo usado para a depressão, e foi desenvolvido para identificar drogas com potencial antidepressivo em animais saudáveis, ou submetidos a modelos de depressão (CAN *et al.*, 2012; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

O labirinto de cruz elevada (LCE), usado para analisar o comportamento do tipo-ansiosos em roedores, busca ver mobilidade, exploração e comportamento locomotor, assim como no CA. Sua diferença é a maior altura do aparato, gerando comportamento aversivo nos animais, especialmente nas áreas abertas. O LCE consiste em uma cruz com 4 braços de comprimentos iguais e que se encontram no centro. Dois destes braços possuem paredes fechadas e dois braços são abertos, fazendo com que o animal se sinta exposto, criando um ambiente aversivo. Os parâmetros medidos nesse teste podem variar, sendo comumente avaliados o tempo nos braços abertos e fechados, o número de entradas e cruzamento entre os braços, o número de tentativas de entrada nos braços abertos e o tempo na zona neutra. Os animais que permanecem mais tempo nos braços fechados podem ser considerados como tendo comportamento do tipo-ansioso. Esse teste pode ser mais complicado de ser executado, por causa da presença dos braços abertos, onde o animal pode sair do aparato (CAROLA *et al.*, 2002; SHIEH; YANG, 2020).

O teste borrifagem de sacarose (TBS) consiste em borrifar uma solução de sacarose no dorso do animal para visualizar o tempo de *grooming*, que é o ato de limpeza própria do animal. Esse teste busca medir a motivação e o autocuidado do animal por meio da observação do *grooming*, sendo considerado um comportamento hedônico, a

redução do tempo que animal passa fazendo essa limpeza própria indica um estado anedônico (DOMINGUES *et al.*, 2022).

Os testes comportamentais também apresentam limitações. Os animais podem apresentar comportamentos opostos em testes diferentes, e é necessário que vários testes sejam executados para o que um resultado possa ser considerado confiável (ACIKGOZ; DALKIRAN; DAYI, 2022). Mesmo com essas limitações, testes comportamentais em animais são necessários para que a segurança de novos medicamentos possa ser avaliada, fazendo com que os benefícios sejam maiores do que os possíveis problemas que podem ocorrer.

### 1.3 ANSIEDADE E DEPRESSÃO

A depressão é uma doença crônica frequente e muito complexa, caracterizada pela falta de energia, tristeza, insônia, alterações na memória e na concentração, anedonia, sentimentos de inutilidade, falta de esperança e até pensamentos suicidas (RIBEIRO; RIBEIRO; VON DOELLINGER, 2017). Ela é uma doença causada pela influência de múltiplos fatores psicológicos e sociais, bem como fatores genéticos e epigenéticos (GAITERI *et al.*, 2014). Fatores de risco para depressão incluem o sexo feminino, envelhecimento, sedentarismo, luto e cognição reduzida, sendo associada ao aumento no risco de mortalidade além de provocar declínio na qualidade de vida (SIVERTSEN *et al.*, 2015). A depressão pode ser classificada em categorias como: depressão maior; depressão menor, subsindrômica ou subliminar; depressão sem tristeza; e transtorno distímico (BLAZER, 2003). Atualmente 280 milhões de pessoas sofrem de depressão no mundo, chegando a 3,8% da população mundial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2023). No Brasil, a sua prevalência é de 15,5%, sendo a prevalência ao longo da vida em até 20% nas mulheres e 12% para os homens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

O transtorno de ansiedade foi classificado no século 20 como uma doença psiquiátrica que necessita de diagnóstico e tratamento médico, sendo diferente da emoção de ansiedade, que pode ser definida como a antecipação de um perigo futuro (CROCQ, 2015). Atualmente, os transtornos de ansiedade, são classificados como: transtorno de ansiedade generalizada, crise do pânico, ansiedade social, ansiedade de separação, fobias, entre outros, e são os transtornos mais comuns na população geral, afetando imensamente o dia a dia das pessoas (WOLGENSINGER, 2015). Em 2019, 301 milhões de pessoas

viviam com transtorno de ansiedade no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2023 apontam o Brasil como o país com o maior número de pessoas ansiosas chegando a 9,3% da população.

Em 2019, 970 milhões de pessoas, 12% da população mundial, foram diagnosticados com transtornos psicológicos, sendo os mais comuns ansiedade e depressão. Em 2020, o número de pessoas vivendo com transtorno de ansiedade e depressão aumentou significativamente por causa da pandemia de COVID-19. Estimativas iniciais mostram que o aumento foi de 26% e 28% para transtorno de ansiedade e depressão respectivamente, em apenas um ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022). Enquanto opções de tratamento e prevenção existem, muitas pessoas ainda sofrem com estigma, discriminação e violação dos direitos humanos. No Brasil, durante a pandemia de COVID-19, 40% dos brasileiros reportaram sintomas de depressão e 50% apresentaram sintomas de transtorno de ansiedade (BARROS *et al.*, 2020).

Enquanto a depressão tende a acometer pessoas mais velhas, o transtorno de ansiedade aparece em todas as faixas etárias, e tem cada vez mais acometido crianças e adolescentes, estando presente em cerca de 15% a 20% das pessoas com menos de 18 anos (BEESDO; KNAPPE; PINE, 2009; HINZ *et al.*, 2019). As duas doenças, transtorno de ansiedade e depressão, também são, muitas vezes, vistas juntas. Entre os indivíduos com depressão grave, em média 35% apresentam algum tipo de transtorno de ansiedade, sendo a mais comum a ansiedade social, acontecendo em 48% dos pacientes com depressão grave (ADAMS *et al.*, 2016). Outros transtornos de ansiedade comuns em pessoas com depressão grave são as fobias (45%) e o transtorno de ansiedade generalizada (44%) (ADAMS *et al.*, 2016).

Doenças psiquiátricas como o transtorno de ansiedade e depressão afetam diversas áreas na vida do paciente, aumentando os gastos na saúde e o risco do desenvolvimento de outras doenças (HOHLS *et al.*, 2021). Um levantamento publicado pela Universidade de Cambridge, na Inglaterra, mostrou que o gasto individual total com depressão em adultos pode chegar a mais de 18.000 dólares americanos por pessoa durante as suas vidas (KÖNIG; KÖNIG; KONNOPKA, 2019). No Brasil entre os anos de 2010 e 2018 foram gastos pelo governo em média Int\$ 254.276.067,49 de dólares internacionais por ano, totalizando Int\$ 2.288.511.607,39 para o tratamento de depressão (MERCEDDES *et al.*, 2023).

O tratamento para pessoas com transtorno de ansiedade e depressão pode ser mais complicado. Intervenções psicológicas se mostram inefetivas em até 50% dos pacientes com transtorno de ansiedade e depressão (MARWOOD *et al.*, 2018). Muitos fármacos utilizadas no tratamento da depressão também possuem efeitos ansiolíticos, sendo então o protocolo que o tratamento de inicie com a depressão e os demais sintomas do transtorno de ansiedade sejam tratados com intervenções psicológicas (TILLER, 2013).

Muitos dos sintomas do transtorno de ansiedade e depressão também podem prejudicar a qualidade de vida do paciente (AGYAPONG *et al.*, 2022). O transtorno de ansiedade está associado a problemas emocionais, perda do funcionamento social, dores, perda da vitalidade e perda do bem-estar emocional, aumentando de 10% até 35% as chances desses sintomas aparecerem. Já a depressão é capaz de aumentar as chances desses sintomas de 10% até 46% (BRENES, 2007). Estudos mostram que os sintomas de transtorno de ansiedade e depressão moderada ou grave podem impactar mais a qualidade de vida do que doenças como diabetes, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio (BRENES, 2007). O estresse crônico causado pela vida profissional ou pessoal, doenças como a diabetes tipo 1 e problemas cardiovasculares, podem desencadear o aparecimento de doenças como o transtorno de ansiedade e a depressão (BUCHBERGER *et al.*, 2016; HARE *et al.*, 2014).

Em doenças infecciosas como a sepse, os sobreviventes a internações hospitalares também apresentam problemas psicológicos. tais como o transtorno de ansiedade e depressão. Dos sobreviventes de casos severos de sepse e de choque séptico, 67% dos pacientes apresentam sintomas de ansiedade e 46% de depressão, nas primeiras 24 horas após a alta da UTI, e um ano após, 31% desses pacientes continuam com sintomas de ansiedade e 50% de depressão (CALSAVARA *et al.*, 2020).

#### 1.4 SEPSE

A sepse é uma doença sistêmica de alta fatalidade presente em muitos hospitais em todo o mundo, sendo uma das causas mais comuns de morte na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (RELLO *et al.*, 2017). Ela é uma reação desregulada do sistema imunológico do hospedeiro, além de ser caracterizada pela síndrome da resposta sistêmica (SIRS), que pode surgir a partir de uma infecção por bactérias, vírus (como o Sars-Cov-2), fungos ou protozoários, e pode gerar danos em tecidos e levar a falência dos órgãos

(GONÇALVES, 2015). No Brasil, casos de pacientes sépticos têm aumentado nos últimos trinta anos, chegando a ser a causa de mais de 25% das hospitalizações em UTIs no ano de 2016 (LOBO *et al.*, 2019). Segundo o Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS), 120.166 casos de sepse e choque séptico foram registrados no período entre 2005 e 2020 no Brasil. Só no ano de 2021, o total de pacientes com sepse e choque séptico foi de 12.458, onde a letalidade foi de 29,1% para os pacientes sépticos e 61,6% para os de choque séptico (ILAS, 2021).

A sepse também pode causar disfunção cerebral ou alteração no estado mental do paciente, causando encefalopatia séptica, isso sendo bem comum e difícil de ser detectada, principalmente em pacientes de UTI ou ao longo da fase de recuperação (CHAUDHRY; DUGGAL, 2014). Hoje, há o conhecimento que sobreviventes à sepse tem como sequelas limitações cognitivas e funcionais de longo prazo, sendo a sepse um fator de risco para o desenvolvimento de sintomas de demência (SINGER *et al.*, 2016). Foi descoberto também que alterações neuropatológicas semelhantes estão presentes tanto na sepse e na doença de Alzheimer (DA), incluindo neuroinflamação, morte neural e perda sináptica (BASAK *et al.*, 2021).

O desenvolvimento da sepse é conhecido por ser capaz de gerar ferroptose, uma morte celular dependente de ferro (WANG *et al.*, 2020). A resposta inflamatória da sepse causa imunossupressão e morte celular descontroladas, que levam aos danos teciduais. É visto que, impedindo a morte celular, seria possível aumentar as chances de sobrevivência de pessoas sépticas (CAO; YU; CHAI, 2019).

A sepse em animais pode ser induzida de diversas maneiras, podendo ser sepse pulmonar, gastrointestinal, cutânea, ou até não específica (GU *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2022). A maneira mais comum de induzir a sepse é pela via gastrointestinal, realizada por meio da técnica de ligação e perfuração cecal (CLP), que consiste em perfurar o intestino grosso do animal para promover a proliferação das bactérias presentes no intestino (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Outra forma de indução séptica é por meio de bactérias. A mais comum a ser usada é a bactéria *Escherichia coli*, mas também é comum o uso da bactéria *Klebsiella pneumoniae* (*K.p*), uma bactéria mais comum nos casos de sepse em humanos e capaz de gerar sepse pulmonar (NAMIKAWA *et al.*, 2022; URANGA-MURILLO *et al.*, 2021).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma componente da parede celular das bactérias gram-negativa que causa forte resposta inflamatória em animais (GRAM; KOWALEWSKI, 2022). O LPS é usado na indução da endotoxemia em modelos animais, gerando um processo inflamatório agudo (LI, Rongging *et al.*, 2022). Além disso, o LPS causa neuroinflamação desregulada similar à que acontece durante a depressão, podendo então ser um modo de induzir a depressão em animais. Em trabalhos pré-clínicos, o camundongo é o animal mais usado como modelo de depressão aguda (LI, Weifen *et al.*, 2021; LIEBERKNECHT *et al.*, 2017).

Alterações comportamentais foram comprovadas em modelos experimentais com camundongos em que comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso puderam ser vistos 24h após o início da sepse, quando avaliados através de TSC e LCE, respectivamente (DAL-PIZZOL *et al.*, 2021). Testes comportamentais realizados duas semanas após o início da sepse induzida por CLP indicaram que a inflamação causada pela sepse prejudica a cognição, aprendizado e memória (MEI; LI; ZUO, 2021). Bonorino (2021) observou alterações em 2, 3, 7, 14 e 30 dias após a sepse pulmonar induzida por *K.p.* A partir dos dados obtidos com os testes CA e LCE foi sugerido que a sepse experimental levou ao comportamento do tipo-ansioso em todos os tempos testados. Os TSC e TBS também sugeriram que a sepse induziu comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo nos animais em todos os tempos testados (BONORINO, 2021). Sendo assim, há evidências de que a sepse promove alterações comportamentais, como comportamento tipo-ansioso, tipo-depressivo e perda de memória.

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O CMS121, molécula baseada no flavonoide fisetina, tem apresentado resultados promissores como anti-inflamatório e neuroprotetor, impedindo a morte celular por ferroptose, sendo atualmente um candidato a medicamento para a DA. Adicionalmente, também apresenta efeitos neuroprotetores antidepressivos e ansiolíticos. A DA e a sepse apresentam alterações neuropatológicas muito próximas, sendo a sepse uma das causas mais comuns de morte na UTI e um problema para hospitais em todo o mundo. Assim,



este trabalho busca observar os benefícios do CMS121, como tratamento para sepse, por meio de testes comportamentais em camundongos.

Considerando os benefícios já vistos, hipotetizamos que o CMS121 é capaz de “proteger” contra comportamentos do tipo-ansioso e tipo-depressivo, e que pode ajudar na recuperação da sepse.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar se o tratamento com CMS121 é capaz de modificar comportamentos do tipo-depressivo e do tipo-ansioso em camundongos ou prevenir os efeitos inflamatórios e comportamentais da sepse experimental.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar efeitos do CMS121 no comportamento do tipo-ansioso e do tipo-depressivo em animais saudáveis;
- Comparar curva de recuperação (mortalidade, perda de peso, escore clínico) entre animais sem e com tratamento de CMS121 em dois modelos experimentais de sepse;
- Analisar os potenciais efeitos protetores do tratamento com CMS121 em relação às alterações comportamentais do tipo-depressivo e no tipo-ansioso em modelo experimentais de sepse.

## 4. MATERIAL E METODOS

### 4.1 ANIMAIS

Este projeto foi devidamente submetido e está aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo n° 3550051019 (Anexo 1).

Este estudo utilizou camundongos Swiss fêmeas, que receberam todos os cuidados de acordo com as diretrizes e normas do COBEA e CONCEA. Os animais foram obtidos do biotério central da UFSC e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UFSC sob condições de alojamento e manutenção de acordo com as exigências do CEUA. Os animais foram alocados em caixas em estantes ventiladas e iluminação com ciclo claro-escuro de 12h, com o ciclo claro iniciando as 7 horas da manhã e o ciclo escuro iniciando as 19 horas da noite. A temperatura e umidade foram controladas a  $22 \pm 2$  °C e 60–80%, respectivamente. Em todos os protocolos os animais foram pesados diariamente ou a cada dois dias, o consumo de água e de ração foi mensurado e apresentado como consumo por animal. Os animais foram agrupados em caixas grandes de até 10 animais e em caixas pequenas, de até 4 animais. Foi também aplicado um escore clínico aos animais para medir o avanço da doença por características físicas.

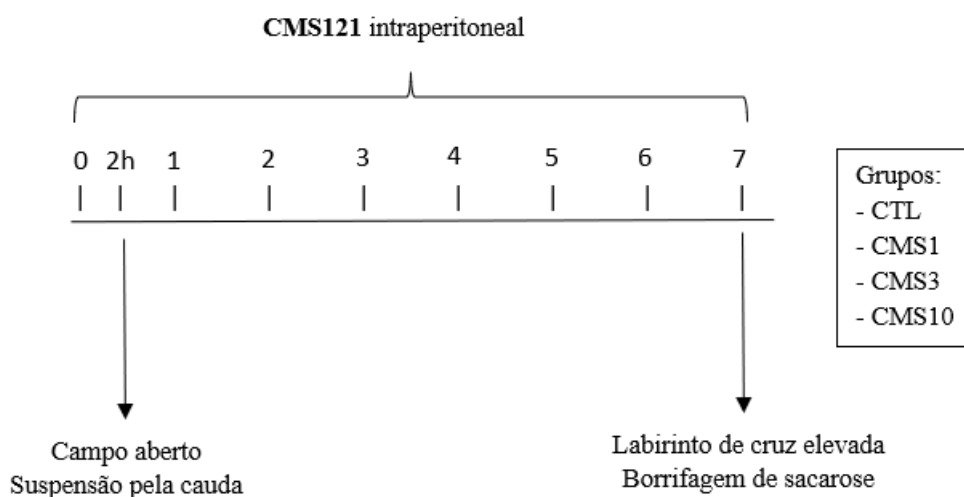
### 4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Foram realizados três protocolos experimentais com o CMS121, reagente gentilmente doado pela Prof. Dra. Pamela Maher do *Celular Neurobiology Laboratory* do Instituto Salk para Estudos Biológicos (La Jolla, Califórnia). O primeiro protocolo avaliou os efeitos do CMS121 quanto aos comportamentos tipo ansioso e tipo depressivo em animais saudáveis. O segundo e o terceiro experimento visaram investigar se o CMS121 é capaz de proteger os animais em dois modelos de sepse. O segundo experimento analisou animais com sepse pulmonar induzida por bactéria *Klebsiella pneumoniae* (*K.p*), cuja cepa foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Jamil Assreuy do Laboratório de Óxido Nítrico, do Departamento de Farmacologia da UFSC. O terceiro experimento verificou os possíveis benefícios do CMS121 em animais que receberam lipopolissacarídeo de bactérias (LPS, *E. coli*) adquirido pelo Sigma-Aldrich Brasil (Cotia, São Paulo, lote 000153963).

#### 4.2.1 Efeitos do CMS121 sobre os comportamentos do tipo-ansiosos e do tipo-depressivo em animais saudáveis

Na primeira etapa experimental os animais foram agrupados em 4 grupos com 10 animais em cada, sendo estes o grupo controle (CTL) e os que receberam CMS121: 1, 3 e 10 mg/kg do animal. O CMS121 foi inicialmente diluído em DMSO 5%, e em seguida em propilenoglicol 50%. Foram aplicados 3 ml/kg do animal desta solução via intraperitoneal (*i.p.*) em injeções diárias por 7 dias. Testes de comportamento foram realizados nestes animais: o CA e o teste de TSC foram realizados 2 horas após a primeira injeção de CMS121, o teste de LCE e o TBS foram feitos no sétimo dia conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Desenho experimental da primeira etapa



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Desenho experimental para avaliar os possíveis efeitos antidepressivos e ansiolíticos do CMS121 em animais saudáveis. Os animais receberam por injeção *i.p.* 3 ml/kg do animal da solução com CMS121 nas doses (mg/kg) de 1 (CMS1), 3 (CMS3) e 10 (CMS10) uma vez por dia por 7 dias. O grupo controle (CTL) recebeu o veículo (DMSO e propilenoglicol) sem o CMS121. Duas horas após o início do tratamento foram feitos o CA e TSC. Sete dias após o início do tratamento foram feitos os testes LCE e TBS. Todos os grupos com 10 animais.

#### 4.2.2 Efeito do tratamento com CMS121 em um modelo de sepse induzido pela bactéria *K.p.*

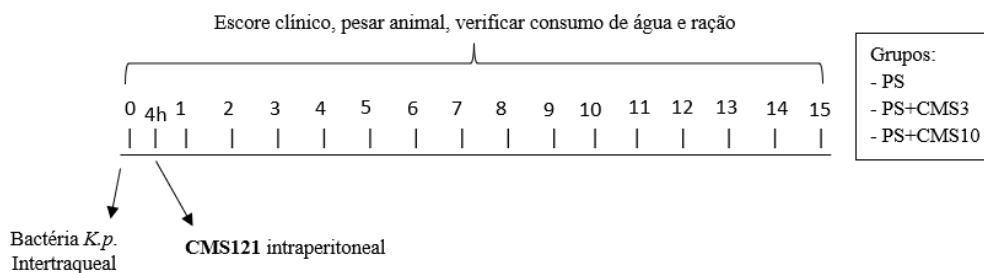
Na segunda etapa experimental foram utilizados 3 grupos de 10 animais cada. Todos os animais desta etapa receberam injeção intratraqueal de *K.p.* As baterias liofilizadas foram suspensas em 45 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e mantidas 18 horas a 37°C para expansão. As bactérias foram lavadas usando uma solução tampão fosfato-salino (PBS) estéril, lavadas e centrifugadas (3 vezes a 21°, 4000 rpm por 20 minuto cada) e o sedimento resultante foi coletado. Foi realizado uma diluição seriada para determinação da quantidade de bactérias através da leitura da densidade óptica a 630nm através do leitor de microplacas, e comparando com uma curva padrão. A contagem de bactérias foi realizada em câmara de Neubauer. A suspensão de bactérias foi diluída em PBS estéril na concentração de  $1,22 \times 10^5$  de unidades de formação de colônias de bactérias para que fossem injetadas no animal.

Os animais foram anestesiados com uma solução composta por cetamina (3 mL), xilazina (1,8 mL) e PBS (25,2 mL), e 10 ml/kg do animal foi aplicado no abdome em uma inclinação de 45 graus, pela via *i.p.* Uma incisão foi realizada na região ventral do pescoço, a musculatura foi afastada, para permitir a injeção intratraqueal de 0,05 mL de PBS contendo as bactérias. Após o procedimento, a pele foi suturada e os animais receberam PBS subcutâneo (30 mL/kg) para reposição fluídica (SORDI *et al*, 2013).

Os animais foram agrupados em 3 grupos de 10 animais cada, onde todos receberam a bactéria. Dois grupos receberam, além da instilação pulmonar de *K.p.*, CMS121 nas doses de: 3 (PS+CMS3) e 10 (PS+CMS10) mg/kg do animal. O CMS121 foi diluído em DMSO 5%, e em propilenoglicol 50%. Foram aplicados 3 ml/kg do animal dessa solução via intraperitoneal 4 horas após a indução da sepse, conforme a Figura 2. Os animais pneumosépticos (PS), que não receberam o CMS121, foram injetados com o seu veículo, DMSO 5% e propilenoglicol 50%.

Testes comportamentais de campo aberto foram realizados durante essa etapa, porém não foram incluídos nesse trabalho por causa de fatores externos, dos ambientes em que os animais foram mantidos e colocados para a realização do teste, que acabaram influenciando no comportamento animal.

Figura 2 – Desenho experimental da segunda etapa



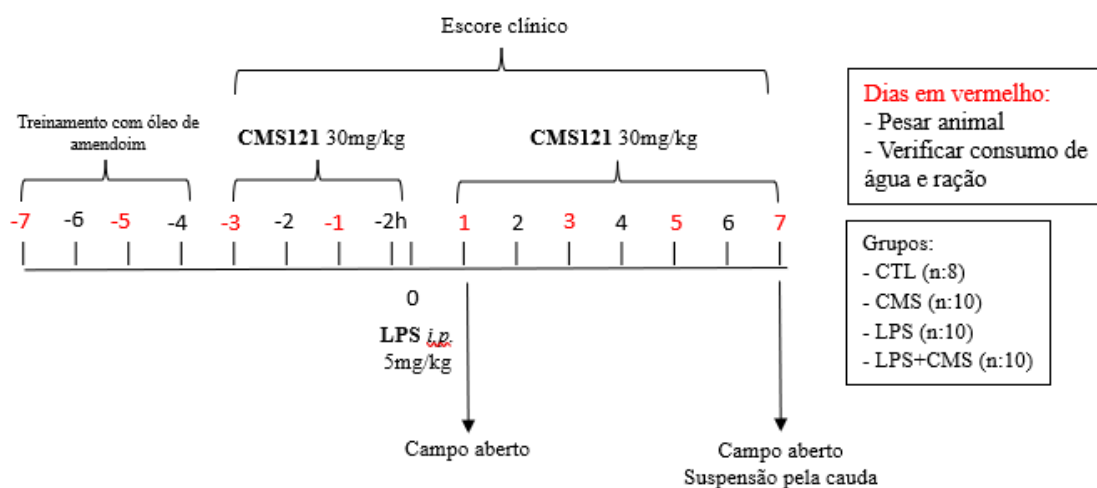
Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Desenho experimental para avaliar os possíveis efeitos do CMS121 na sepse. Os animais receberam injeção *i.p.* 3 ml/kg do animal da solução com CMS121 nas doses (mg/kg) de 3 (PS+CMS3) e 10 (PS+CMS10) quatro horas após a indução da sepse. O pneumoséptico (PS) recebeu o veículo (DMSO e propilenoglicol) sem o CMS121. Todos os grupos com 10 animais.

#### 4.2.3 Potencial efeito protetor do CMS121 em animais expostos ao LPS

Para o último experimento os animais foram agrupados em 4 grupos: controle (CTL), CMS, CMS+LPS e LPS. Os grupos de 8-10 animais que receberam CMS121 realizaram adaptação de ingesta voluntária com óleo de amendoim 7 dias antes da injeção de LPS, e começaram o tratamento de CMS121 3 dias antes da injeção de LPS. Nessa etapa foi utilizado uma dose de CMS121 de 30 mg/kg do animal, diluído em óleo de amendoim, e aplicado através de ingestão voluntária (aproximadamente 100  $\mu$ L/dose). A simulação de sepse foi induzida por uma injeção intraperitoneal de 5 mg/kg de LPS diluído em PBS. Vinte e quatro horas e 7 dias após a injeção de LPS os animais foram expostos ao CA por 5 minutos. O teste de TSC foi realizado no sétimo dia conforme demonstra a Figura 3.

Figura 3- Desenho experimental da terceira etapa



Fonte: Elaborado pela autora

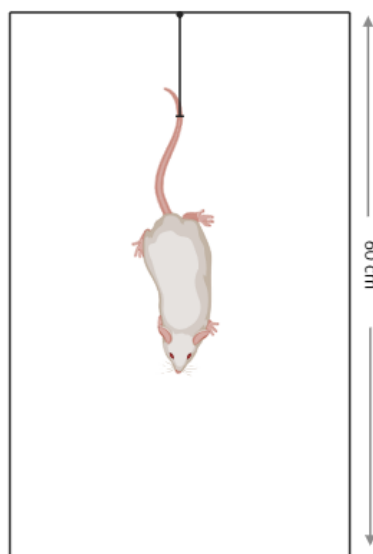
Legenda: Desenho experimental para avaliar os possíveis efeitos do CMS121 no tratamento com LPS. Os grupos foram treinados a ingerir o óleo de amendoim entre os dias -7 e -4. Os animais receberam 100 µl da solução com CMS121 em óleo de amendoim na dose de 30 mg/kg do animal. O tratamento com CMS121 iniciou 3 dias antes (-3 a -1) da exposição ao LPS. Os grupos controle (CTL) e LPS receberam o veículo (óleo de amendoim) do CMS121. Os grupos CTL e CMS receberam o veículo do LPS (PBS). Foi realizado o CA 24 horas após a injeção de LPS e novamente 7 dias após a injeção. Foi feito o teste de TSC 7 dias após a injeção de LPS. Grupos com 8-10 animais.

### 4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 4.3.1 Teste de Suspensão pela Cauda

O teste de suspensão pela cauda (TSC) foi utilizado para avaliar o comportamento tipo depressivo. Envolve a suspensão dos camundongos acima do solo, com a cauda presa no aparato, a 60cm do chão, sem conseguir alcançar as paredes laterais (Figura 4). Neste teste o comportamento dos animais foi gravado por 6 minutos, onde foi marcado o tempo que os animais permaneceram imóveis, ou sem mexer as patas dianteiras e traseiras ao mesmo tempo. A redução do tempo de imobilidade é um indicador confiável do efeito antidepressivo (CAN *et al.*, 2012).

Figura 4 – Esquema do aparato utilizado no teste de TSC



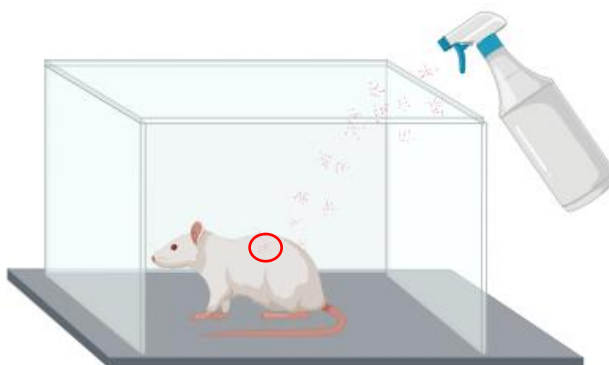
Fonte: Ilustração da autora com a utilização do software *Biorender*®

Legenda: Ilustração do aparato de TSC onde os animais ficam suspenso por uma fita adesiva que prende sua cauda. Linhas laterais indicando as paredes do aparato. Neste teste, o animal não consegue alcançar as paredes laterais.

#### 4.3.2 Teste de borrifagem de sacarose

Nesse teste foi borrifado 1 mL de uma solução contendo 10% de sacarose no dorso do animal, que foi disposto, individualmente, em uma caixa acrílica (30 x 30 x 20 cm) (Figura 5). Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose “suja” o pelo do animal, induzindo um comportamento de limpeza (*grooming*). Depois de aplicar a solução de sacarose, a frequência (duração) e a latência para o início do comportamento de *grooming* foram observadas por 5 minutos e esses tempos foram marcados. Os indícios de falta de autocuidado e comportamento motivacional são considerados como paralelos a alguns sintomas de depressão, como a anedonia (WILLNER, 2005)

Figura 5 – Esquema do aparato utilizado no TBS



Fonte: Ilustração da autora com a utilização do software *Biorender*®

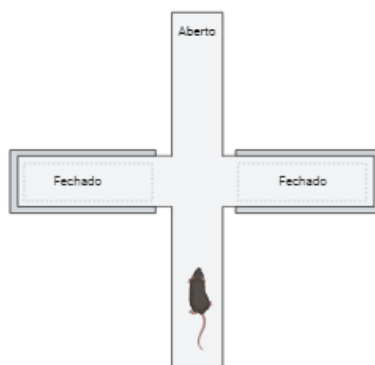
Legenda: Ilustração do TBS onde é borrifado uma solução de sacarose no dorso do animal, a fim de estimular o comportamento de *grooming*.

#### 4.3.3 Teste de labirinto em cruz elevada

Para investigar o comportamento do tipo-ansioso, os camundongos foram avaliados no aparato de LCE, confeccionado de acrílico cinza com quatro braços (dois abertos sem paredes e dois fechados por paredes de 15 cm de altura) com 30 cm de comprimento e 5 cm de largura cada, elevado a 50 cm do chão (Figura 6). Neste teste, os animais foram colocados individualmente no centro do aparato, e seu comportamento foi registrado por 5 minutos. O número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados foram mensurados. As entradas são contadas quando o animal entra com as 4 patas no braço do aparato. Além disso, outras variáveis são medidas, como o tempo de permanência na zona neutra, entre os quatro braços, e o número de tentativas nos braços abertos, onde o animal coloca apenas parte do corpo nos braços abertos. Esse teste baseia-se na propensão dos roedores para os espaços escuros e fechados e um medo incondicionado das alturas/espaços abertos. Assim, o comportamento ansiolítico é caracterizado pelo aumento do tempo despendido e/ou aumento no número de entradas no braço fechado (WALF; FRYE, 2007).



Figura 6 – Esquema do aparato utilizado no teste LCE



Fonte: Ilustração da autora com a utilização do software *Biorender*®

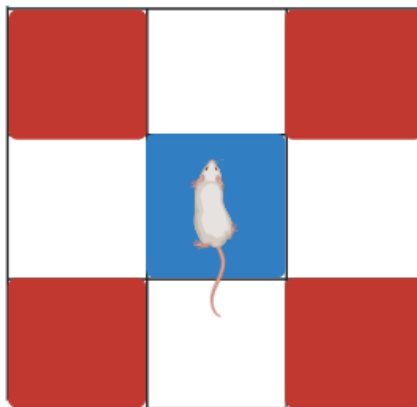
Legenda: Ilustração do aparato do LCE, onde o animal pode movimentar entre 2 braços abertos e 2 braços fechados, e o aparato fica 50 cm acima do chão.

#### 4.3.4 Campo Aberto

O campo aberto (CA) foi utilizado para analisar o comportamento tipo ansioso e de locomoção exploratória do animal. Para o teste, cada animal foi colocado separadamente em uma caixa de acrílico com paredes brancas e fundo preto, conhecida como arena de CA (40x40 cm), e seu comportamento foi registrado e, posteriormente, analisado, durante 5 minutos (Figura 7). O CA foi dividido em 9 quadrantes, sendo estes os cantos (em vermelho na figura 7) e o centro (em azul na figura 7). A análise das imagens foi realizada através do software ANY-maze®, da empresa Stoelting Co. (Chicago, Estados Unidos da América), com mensuração da distância percorrida (cm), tempo nas áreas da arena em segundos (s) e número de entradas em cada uma das áreas. Outros parâmetros foram medidos por inspeção visual, como número de bolos fecais, o número de *rearings* (movimentos exploratórios normais dos murinos, nos quais o animal se ergue ou fica apoiado sobre as patas traseiras), e no caso da primeira etapa, a distância percorrida (em número de entradas em cada área) e tempo no centro (segundos) (DAVIS; STEVENS; THOMAS CURTIS, 2017). O tempo em cada quadrante e a distância

percorrida estão relacionados ao comportamento tipo ansioso (BAILEY; CRAWLEY, 2009).

Figura 7 – Esquema para o aparato utilizado no CA



Fonte: Ilustração da autora com a utilização do software *Biorender*®

Legenda: Exemplo da divisão do CA. Geralmente o aparato é monocromático (branco ou preto), nesta ilustração as áreas em vermelho são consideradas canto e área em azul considerada centro.

#### 4.4 ESCORE CLÍNICO

O escore clínico serve para avaliar a morbidade dos animais. A sua pontuação varia de 0 a 6, onde quanto maior a pontuação, menor o bem-estar do animal (Tabela 1). O teste é feito diariamente, onde cada animal é manuseado e observado por cerca de um minuto pra que a sua aparência e comportamento possam ser medidos (GONÇALVES *et al.*, 2017).

Tabela 1 – Escore clínico

CARACTERÍSTICAS	ESCORES		
	0	1	2
Aparência	Pelos lisos	Pelos arrepiados	
Aspecto olhos	Normal	Com secreção	
Consciência	Alerta	Sonolento	
Respiração	Rápida/normal	Lenta/laboriosa	
Atividade	Ativo	Letárgico	Moribundo

Fonte: Adaptado de Gonçalves (2017)

Legenda: Escore Clínico utilizado para avaliação da morbidade dos animais.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estáticas dos gráficos foram feitas através do software GraphPad Prism® 8 da empresa Dotmatics (Boston, Estados Unidos da América). Os gráficos de barra apresentam as médias e desvio padrão. Foi realizado o teste de outlier nos dados também utilizando o GraphPad da empresa Dotmatics.

Para as distâncias percorrida (Figura 8a) (Figura 14c) (Figura 15c) e tempo no centro (Figura 8b) (Figura 14d) (Figura 15d) no CA, tempo de latência (Figura 10a) e tempo de *grooming* (Figura 10b) na TBS, no tempo em braços abertos (Figura 11d), tempo em braços fechados (Figura 11e) e tempo em zona neutra (Figura 11f) no LCE, e no tempo de imobilidade na suspensão pela cauda (Figura 9) (Figura 16) foi feito o teste de análise de variação (ANOVA) de uma via. Quando a ANOVA se mostrou significativa, foi utilizado o teste Tukey de múltiplas comparações para detectar diferenças entre os grupos.

Para os números de *rearings* (Figura 8c) (Figura 14a) (Figura 15a), número de bolos fecais (Figura 8d) (Figura 14b) (Figura 15b), número de entradas do centro (Figura 14e) (Figura 15e) e número de entradas nos cantos (Figura 14f) (Figura 15f) no CA, o número de entradas nos braços abertos (Figura 11a), número de entradas em braços fechados (Figura 11b) e número de tentativas de entradas em braços abertos (Figura 11c) no LCE foi feita a ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida pelo teste *post hoc* de Dunn para comparações múltiplas.

Para a mortalidade (Figura 12a) foi feito o teste de sobrevivência chi quadrado Mantel-Cox, Logrank e Gahen-Breslow-Wilcoxon. Para o escore clínico (Figura 12b) e variação de peso (Figura 12e) foi feito o teste ANOVA de duas vias, onde o um fator era o tratamento e o outro o tempo, seguido *post hoc* Tukey para comparações múltiplas. O peso dos animais mortos foi excluído da análise e o escore clínico máximo foi adicionado para os animais mortos. Para o consumo acumulado de água (Figura 12c) e consumo acumulado de ração (Figura 12d) foi feito o teste de regressão linear e comparação das inclinações das retas.

Para o escore clínico da terceira etapa (Figura 13a) e perda de peso da terceira etapa (Figura 13b) foi feito o teste ANOVA, seguido *post hoc* Tukey para comparações múltiplas. Para o consumo de água por animal (Figura 13c) e consumo de ração por animal (Figura 13d) foi feito o teste ANOVA de duas vias (tratamento vs tempo), seguido *post hoc* Tukey para comparações múltiplas.

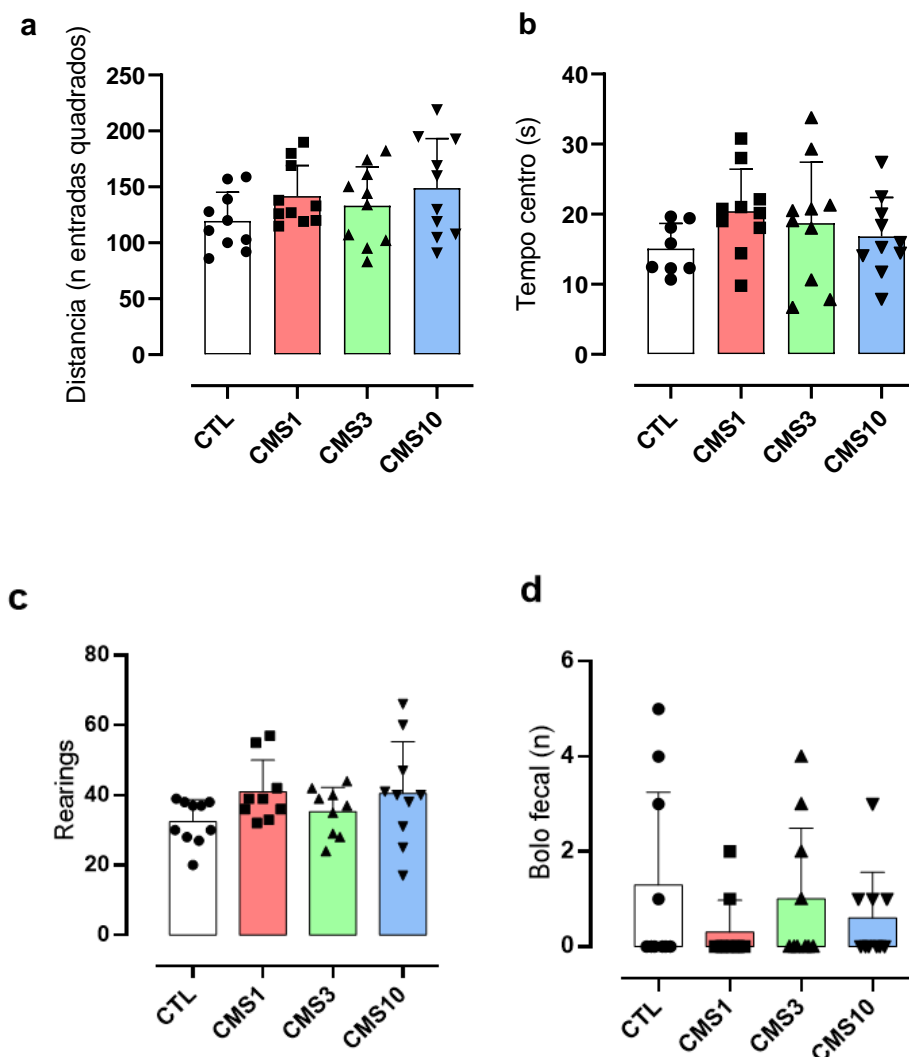
## 5. RESULTADOS

### 5.1 EFEITOS DO CMS121 SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO E DO TIPO-DEPRESSIVO EM ANIMAIS SAUDÁVEIS

Durante a primeira etapa de experimentos cada grupo de animais saudáveis recebeu doses repetidas de CMS121 por injeção *i.p.*, uma vez por dia, durante 7 dias: 1 (CMS1), 3 (CMS3) e 10 mg/kg (CMS10).

No CA realizado duas horas após a primeira dose de CMS121 não foi visto nenhuma diferença estatística entre os grupos na distância percorrida (Figura 8a), no tempo de permanência no centro (Figura 8b), na quantidade de *rearings* (Figura 8c) e no número de bolos fecais (Figura 8d).

Figura 8 – Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no comportamento no CA

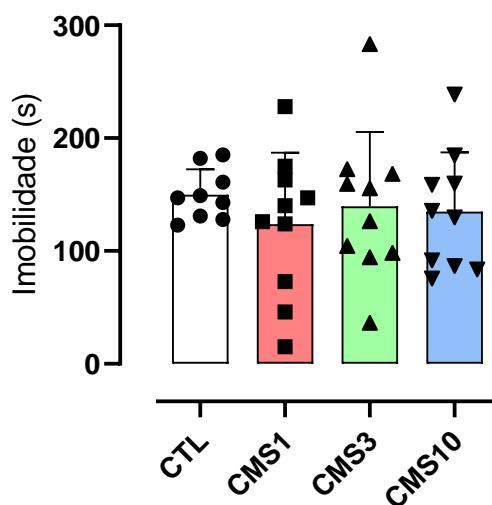


Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Efeito do CMS121 sobre o comportamento no CA realizado duas horas após o início do tratamento. Cada grupo recebeu uma dose diária de CMS121: 1 (CMS1), 3 (CMS3) e 10 (CMS10) mg/kg do animal durante 7 dias por injeção *i.p.* O grupo controle (CTL) recebeu o veículo do CMS121 (DMSO + propilenoglicol). Animais foram expostos ao CA por 5 minutos. (a) Distância percorrida; (b) Tempo no centro; (c) *Rearings*; (d) Bolo fecal. Foram realizados dois experimentos com 5 animais cada e os dados foram agrupados. Gráficos apresentam os valores individuais (símbolos), a média e o desvio padrão positivo (n=10).

O CMS121 não alterou o tempo de imobilidade no TSC, quando feito duas horas após o início do tratamento (Figura 9).

Figura 9 – Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no comportamento no TSC

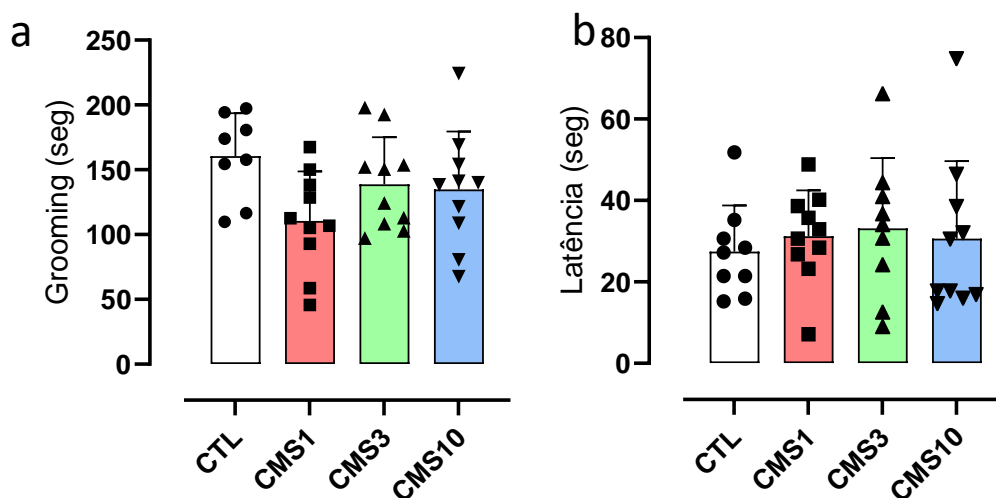


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Efeito do CMS121 sobre o comportamento no teste de TSC feito duas horas após o início do tratamento. Cada grupo recebeu uma dose diária de CMS121: 1 (CMS1), 3 (CMS3) e 10 (CMS10) mg/kg do animal durante 7 dias por injeção *i.p.* O grupo controle (CTL) recebeu o veículo do CMS121 (DMSO + propilenoglicol). Animais foram suspensos no aparato por 6 minutos. Foram realizados dois experimentos com 5 animais cada e os dados foram agrupados. Gráficos apresentam os valores individuais (símbolos), a média e o desvio padrão positivo (n=10).

O TBS, feito 7 dias após o início do tratamento, não apresentou diferença estatística entre os grupos. O CMS121 não apresentou influência no tempo de *grooming* (Figura 10a) ou no tempo de latência (Figura 10b).

Figura 10 – Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no teste BS

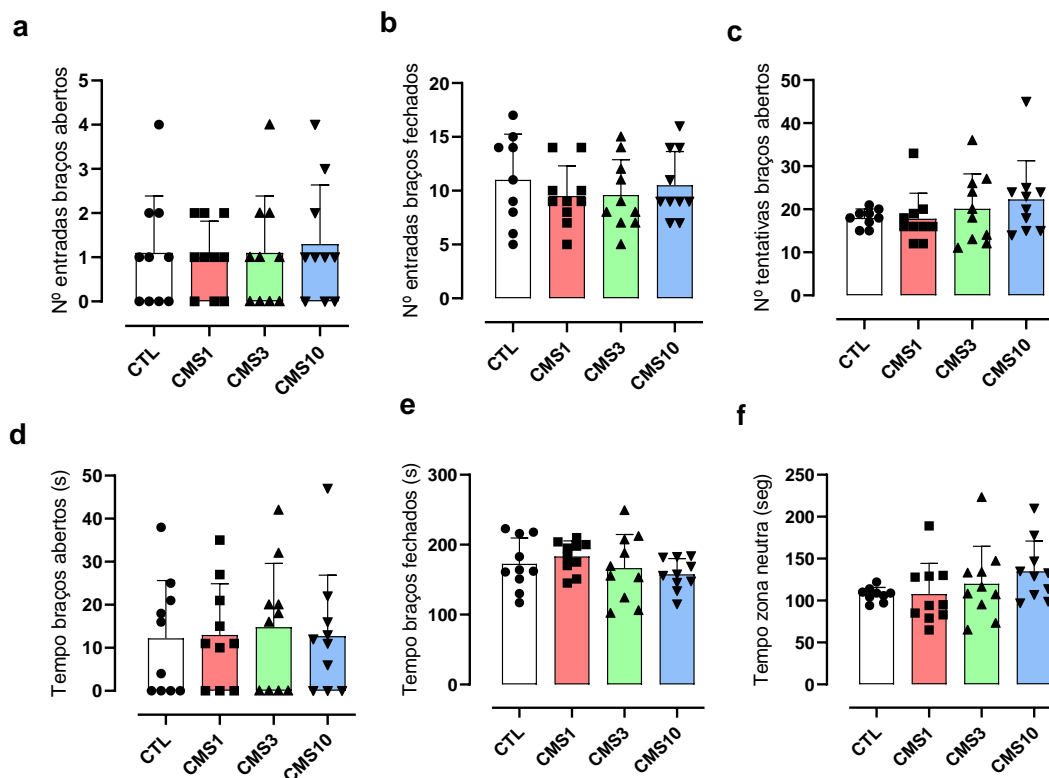


Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Efeito do CMS121 sobre o comportamento no TBS feito sete dias após o início do tratamento. Cada grupo recebeu uma dose diária de CMS121: 1 (CMS1), 3 (CMS3) e 10 (CMS10) mg/kg do animal durante 7 dias por injeção *i.p.* O grupo controle (CTL) recebeu o veículo do CMS121 (DMSO + propilenoglicol). Animais foram observados por 5 minutos dentro do aparato. Foram realizados dois experimentos com 5 animais cada e os dados foram agrupados. Gráficos apresentam os valores individuais (símbolos), a média e o desvio padrão positivo (n=10). (a) Tempo de *grooming*; (b) Tempo de latência.

O tratamento com CMS121 não gerou alterações no teste do LCE no número de entradas nos braços abertos (Figura 11a), entrada nos braços fechados (Figura 11b), tentativas de entrada nos braços fechados (Figura 11c), tempo nos braços abertos (Figura 11d), tempo nos braços fechados (Figura 11e) e no tempo na zona neutra (Figura 11f).

Figura 11 - Efeito de doses repetidas de CMS121 em animais saudáveis no LCE



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Efeito do CMS121 sobre o comportamento no teste de LCE feito sete dias após o início do tratamento. Cada grupo recebeu uma dose diária de CMS121: 1 (CMS1), 3 (CMS3) e 10 (CMS10) mg/kg do animal durante 7 dias por injeção *i.p.* O grupo controle (CTL) recebeu o veículo do CMS121 (DMSO + propilenoglicol). Animais foram observados por 5 minutos dentro do aparato. Foram realizados dois experimentos com 5 animais cada e os dados foram agrupados. Gráficos apresentam os valores individuais (símbolos), a média e o desvio padrão positivo (n=10). (a) Número de entradas nos braços abertos; (b) Número de entradas nos braços fechados; (c) Número de tentativas nos braços abertos; (d) Tempo nos braços fechados; (e) Tempo nos braços abertos; (f) Tempo na zona neutra.

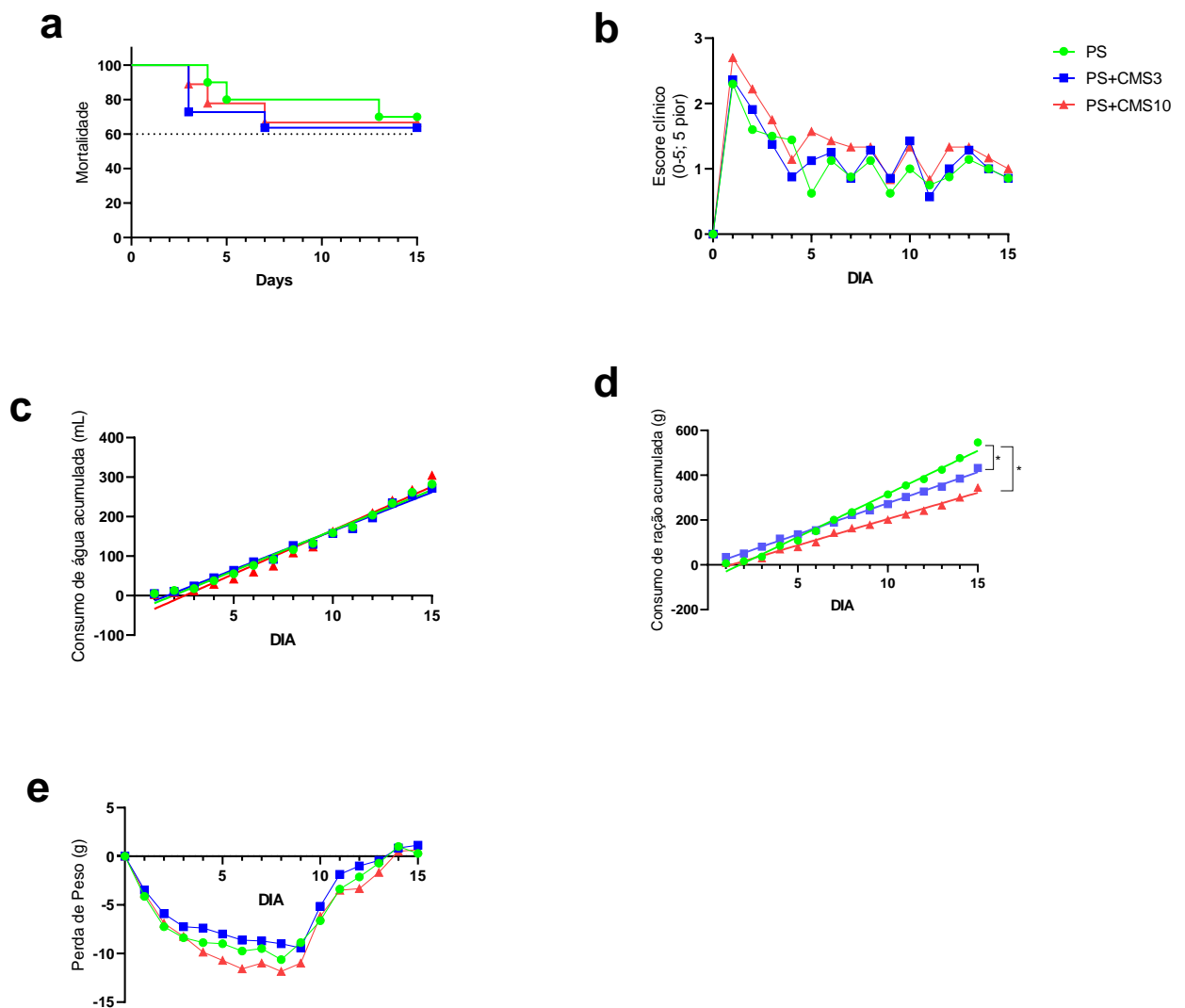
## 5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM CMS121 EM UM MODELO DE SEPSE COM BACTÉRIA *K.p.*

Na segunda etapa a sepse pulmonar foi induzida pela instilação da bactéria *K.p.* na traqueia dos animais. Quatro horas depois os animais receberam uma dose de CMS121 de 3 ou 10 mg/kg, aplicada por injeção *i.p.*, e foram avaliados durante 15 dias. A infecção por *K.p.* causou a mortalidade de cerca de 40% dos animais (Figura 12a) durante os 15 dias de tratamento. A média do escore clínico passou de zero (saudável, antes da injeção por *K.p.*) para quase 3, 24 horas após a indução da sepse, e foi diminuindo gradativamente até chegar em aproximadamente 1 no dia 15 do período pós-séptico (Figura 12b). Os



animais sofreram perda de peso até 9 dias após a indução por *K.p.* e recuperaram totalmente o peso ao fim dos 15 dias de tratamento (Figura 12e). O consumo de água (Figura 12c) e ração (Figura 12d) foram constantes durante os 15 dias de tratamento, porém houve uma diminuição no consumo de ração acumulada nos grupos que receberam o CMS121 na dose 3 mg/kg, o que foi mais acentuado na dose de 10 mg/kg, quando comparado ao grupo PS. O tratamento com CMS121 *per se* não alterou a mortalidade, escore clínico, consumo de água, e no peso dos animais em nenhuma das doses testadas (Figuras 12a, 12b, 12c e 12e respectivamente).

Figura 12 – Efeitos do CMS121 sobre a mortalidade, escore clínico, peso, consumo de água e ração em animais sépticos



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Efeitos do tratamento com CMS121 em animais submetidos ao modelo de pneumosepse experimental. Os animais receberam instilação de *K.p.* intrapulmonar e uma injeção de CMS121 em duas doses diferentes: 3 (PS+CMS3) e 10 mg/kg (PS+CMS10). O grupo PS recebeu o veículo do CMS121 (DMSO + propilenoglicol). (a) Mortalidade; (b) Escore clínico; (c) Consumo acumulado de água; (d); Consumo acumulada de ração: houve uma redução no consumo de acumulada de ração quando compara os grupos que receberam o CMS121 com o grupo CTL; (e) Variação de peso. (n=10). Parâmetros medidos diariamente.

### 5.3 POTENCIAL EFEITO PROTETOR DO CMS121 EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS

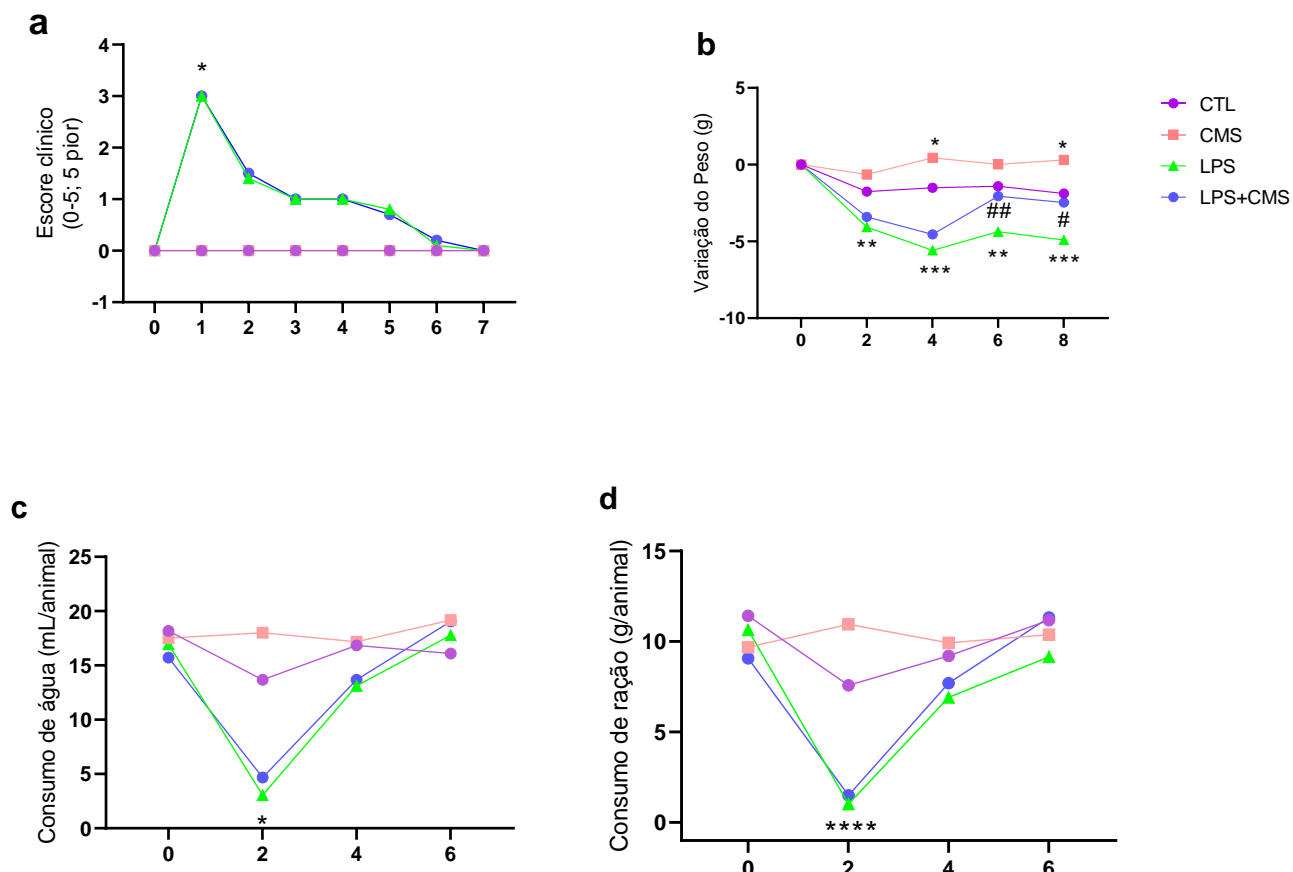
No último experimento, a dose de CMS121 utilizada foi de 30 mg/kg do animal, por via oral (ingestão voluntária). O CMS121 *per se* não influenciou no escore clínico dos animais (Figura 13a). Os animais saudáveis que receberam CMS121 tiveram um aumento de peso quando comparados ao CTL (Figura 13b). Esse aumento pode ser visto no quarto dia ( $p<0,05$ ) e no oitavo dia ( $p<0,05$ ). O CMS121 não influenciou no consumo de água (Figura 13c) e ração (Figura 13d) dos animais, quando comparado aos animais controle.

O tratamento com CMS121 iniciou 3 dias antes da injeção com LPS (5 mg/kg) e foi seguido até o 7° dia após sua injeção. A exposição ao LPS reduziu o bem-estar dos animais nas primeiras 24h, observado através do aumento do escore clínico, que possui o pico no primeiro dia após a injeção com LPS e foi diminuído até chegar à zero no dia sete (Figura 13a). A exposição ao LPS também reduziu de forma significativa o peso dos animais (Figura 13b), sendo que o pico de perda de peso foi 4 dias após a injeção, com perda por volta de 6 g/animal ( $p=0.0001$ ). Não houve melhora desse estado até o 8° dia ( $p=0,0008$ ). O LPS reduziu o consumo de água (Figura 13c) ( $p<0,05$ ) e ração (Figura 13d) ( $p<0,0001$ ) nos primeiros dias, tendo o seu pico no segundo dia após a injeção com LPS e se normalizando até o dia sete.

O grupo LPS+CMS não apresentou diferença no escore clínico quando comparado ao grupo LPS, mostrando que o CMS121 não influenciou no escore clínico. (Figura 13a). Os animais LPS+CMS tiveram uma recuperação mais rápida em relação ao peso, quando comparado com os animais do grupo LPS (Figura 13b). A partir do sexto dia o peso dos animais LPS+CMS já se normalizaram em relação do grupo CTL, e isso continuou no oitavo dia, mostrando então diferença estatística entre os grupos LPS+CMS e LPS no sexto ( $p=0,003$ ) e no oitavo dia ( $p=0,01$ ) (Figura 13b). O grupo LPS+CMS não

apresentou diferença no consumo de água (Figura 13c) e ração (Figura 13d) quando comparado ao grupo LPS, mostrando que o CMS121 não influenciou nesses parâmetros.

Figura 13 – Efeitos do CMS121 sobre escore clínico, peso, consumo de água e ração em animais expostos ao LPS



Fonte: Elaborado pela autora

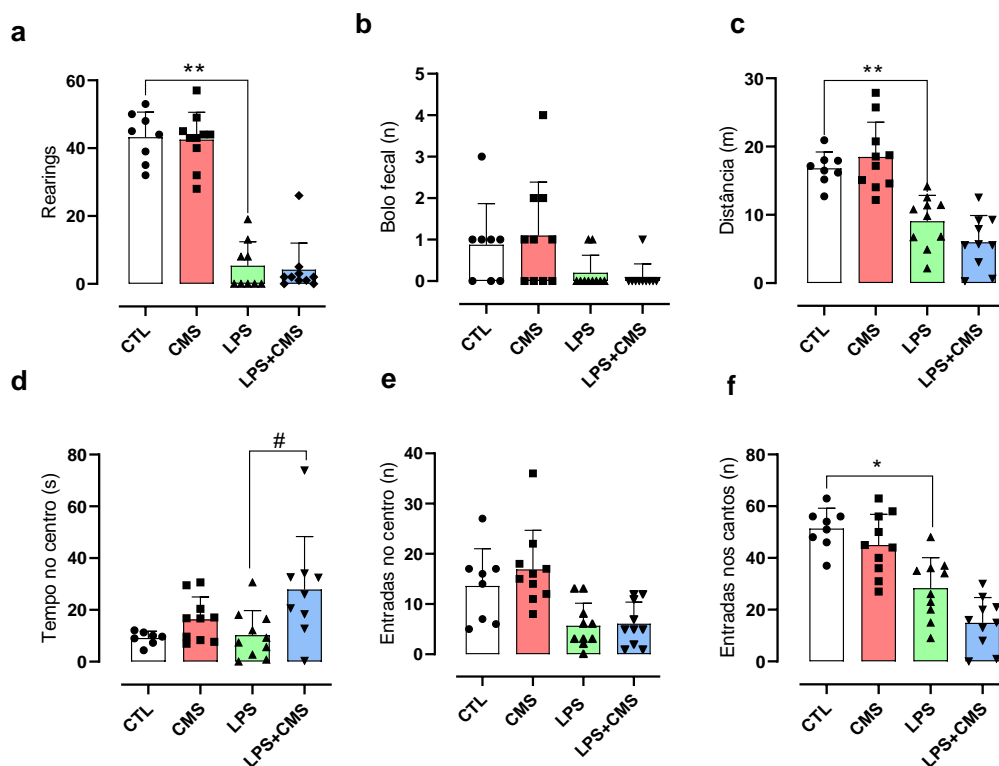
Legenda: Efeitos do tratamento com CMS121 30mg/kg do animal pela via oral, começando 3 dias antes e seguido até 7 dias após a indução por LPS (CMS e LPS+CMS). O grupo controle (CTL) e grupo LPS receberam apenas o veículo do CMS121 (óleo de amendoim). Gráficos apresentam medias diárias de cada grupo. (a) Escore clínico: os grupos que receberam LPS apresentaram aumento do escore clínico; (b) Variação de peso: os grupos que receberam o LPS perderam peso, o grupo LPS+CMS teve uma recuperação mais rápida, voltando a se aproximar do peso do CTL no dia 6, e o grupo CMS teve um aumento do peso quando comparado ao CTL; (c) Consumo de água por animal: os grupos que receberam o LPS diminuíram o consumo de água, tendo esse pico 48 horas após a injeção; (d) Consumo de ração por animal: os grupos que receberam o LPS diminuíram o consumo de ração, tendo esse pico 48 horas após a injeção. (n=8-10). Diferenças com o grupo controle ilustrada (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,0001). Diferenças entre os grupos LPS e LPS+CMS ilustrado (# p<0,05; ## p<0,01). Não foram incluídas no gráfico as diferenças entre os grupos CTL x LPS+CMS, CMS x LPS, CMS x LPS+CMS.

O CMS121 *per se* não gerou influência no número de *rearing* (Figura 14a), número dos bolos fecais (Figura 14b), distância percorrida (Figura 14c), tempo no centro (Figura 14d), número de entradas do centro (Figura 14e) e tempo nos cantos (Figura 14f) do CA.

O LPS causou uma grande diminuição de movimento, como observado no CA (Figura 14) e testado 24 horas após a injeção de LPS. Houve diminuição no número de *rearings* ( $p < 0,01$ ) (Figura 14a), da distância percorrida ( $p = 0,001$ ) (Figura 14c) e o número de entradas no canto ( $p = 0,02$ ) (Figura 14f), quando comparados ao grupo controle. Não foram observadas diferenças na contagem de bolos fecais em relação ao grupo controle (Figura 14b) e nem no número de entradas no centro (Figura 14e), embora haja uma clara tendência a valores inferiores se comparado ao grupo CTL.

O tratamento LPS+CMS não alterou o número de *rearings* (Figura 14a), o número de bolos fecais (Figura 14b), a distância percorrida (Figura 14c), o número de entradas do centro (Figura 14e) e o tempo nos cantos (Figura 14f), porém, o grupo LPS+CMS teve um maior tempo de permanência no centro do CA, quando comparado com o grupo LPS ( $p = 0,025$ ) (Figura 14d).

Figura 14 – Efeitos do CMS121 sobre o comportamento no CA de animais submetidos ao modelo de LPS, avaliados 24 horas após a exposição



Fonte: Elaborado pela autora

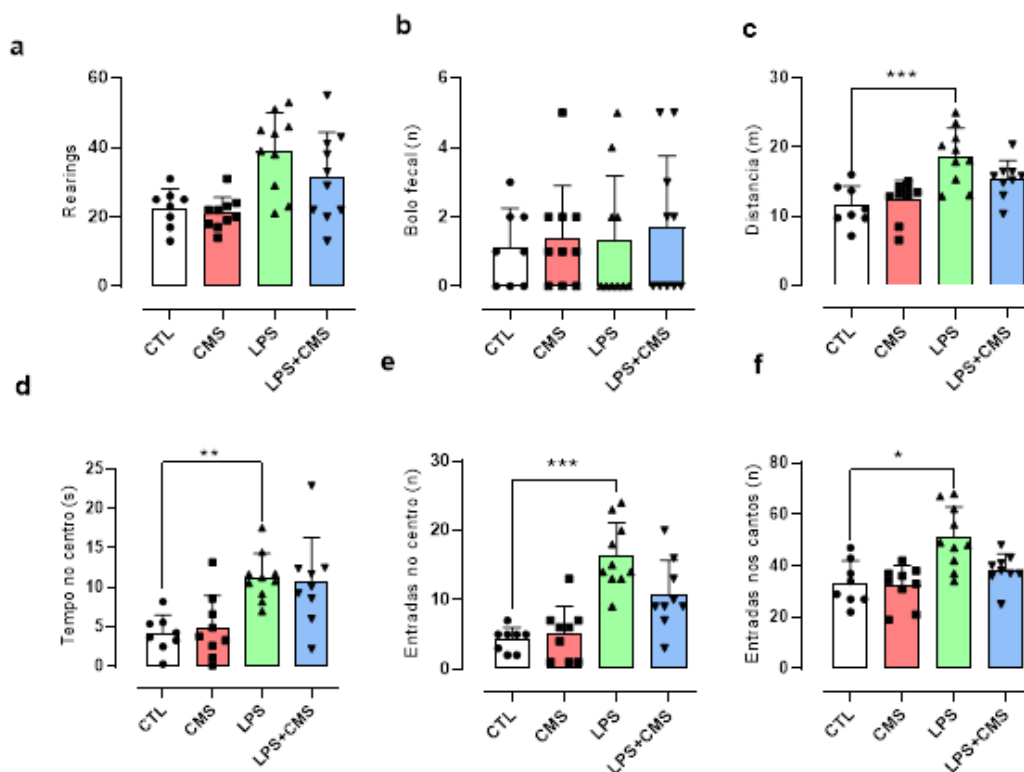
Legenda: Efeito do tratamento com LPS e CMS121 no CA 24h após a injeção de LPS. Os grupos CMS e LPS+CMS receberam 30 mg/kg do animal pela via oral, começando 3 dias antes da injeção de LPS. Os grupos controle (CTL) e LPS receberam o veículo (óleo de amendoim) sem o composto CMS121. Gráficos apresentam os valores individuais, a média dos valores e o desvio padrão positivo. (a) *Rearings*: LPS apresentou redução no número de *rearing*s quando comparado ao grupo CTL; (b) Bolo fecal; (c) Distância percorrida: grupo LPS apresentou redução na distância percorrida quando comparado ao grupo CTL; (d) Tempo no centro: grupo LPS+CMS apresentou aumento no tempo de permanência no centro do CA quando comparado ao grupo LPS; (e) Entradas no centro; (f) Entradas no canto: grupo LPS apresentou diminuição do número de entradas nos cantos quando comparado ao CTL. (n=8-10). Diferenças com o grupo controle ilustrada (\* p<0,05; \*\* p <0,01). Diferenças entre os grupos LPS e LPS+CMS ilustrado (# p<0,05). Não foram incluídas no gráfico as diferenças entre os grupos CTL x LPS+CMS, CMS x LPS, CMS x LPS+CMS.

O CMS121 em animais saudáveis não gerou influência no número de *rearing* (Figura 15a), número dos bolos fecais (Figura 15b), distância percorrida (Figura 15c), tempo no centro (Figura 15d), número de entradas do centro (Figura 15e) e tempo nos cantos (Figura 15f) do CA quanto observados sete dias após a injeção.

No sétimo dia após a injeção de LPS, os animais que receberam LPS apresentaram um aumento no comportamento exploratório, quando comparados ao grupo controle (Figura 15). Não houve diferença no número de *rearing* (Figura 15a) e nem no número de bolos fecais (Figura 15b), mas houve um aumento na distância percorrida (p=0,0003) (Figura 15c), no tempo no centro (p=0,0037) (Figura 15d), nas entradas no centro (p=0,0003) (Figura 15e) e nas entradas do canto (p=0,014) (Figura 15f), quando comparado ao grupo controle.

O tratamento LPS+CMS não alterou o número de *rearing*s (Figura 15a), o número de bolos fecais (Figura 15b), a distância percorrida (Figura 15c), o tempo de permanência no centro (Figura 15d), o número de entradas do centro (Figura 15e) e o tempo nos cantos (Figura 15f) no CA, 7 dias após a injeção quando comparado ao grupo LPS.

Figura 15 - Efeitos do CMS121 sobre o comportamento no CA de animais submetidos ao modelo de LPS, avaliados 7 dias após a exposição

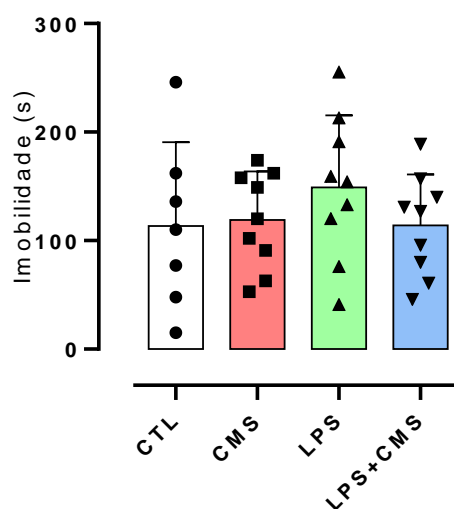


Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Efeito do tratamento com LPS e CMS121 no CA 7 dias após a injeção de LPS. Os grupos CMS e LPS+CMS receberam 30 mg/kg do animal pela via oral, começando 3 dias antes da injeção de LPS. Os grupos controle (CTL) e LPS receberam o veículo (óleo de amendoim) sem o composto CMS121. Gráficos apresentam os valores individuais, a média dos valores e o desvio padrão positivo. (a) *Rearings*; (b) Bolo fecal; (c) Distância percorrida: grupo LPS teve um aumento na distância percorrida quando comparado ao grupo CTL; (d) Tempo no centro: grupo LPS teve um aumento no tempo de permanência no centro quando comparado ao grupo CTL; (e) Entradas no centro: grupo LPS teve um aumento no número de entradas no centro quando comparado ao grupo CTL; (f) Entradas no canto: grupo LPS teve um aumento no número de entradas nos cantos quando compara do grupo CTL. (n=8-10). Diferenças com o grupo controle ilustrada por asterisco (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ). Não foram incluídas no gráfico as diferenças entre os grupos CTL x LPS+CMS, CMS x LPS, CMS x LPS+CMS.

Não houve diferença significativa de comportamento no teste de TSC ao ser avaliado 7 dias após a injeção de LPS, quando os quatro grupos foram comparados (Figura 16).

Figura 16 – Efeitos do CMS121 sobre o comportamento no TSC de animais submetidos ao modelo de LPS, avaliados 7 dias após a exposição



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Efeito do tratamento com LPS e CMS121 no teste de TSC 7 dias após a injeção de LPS. Os grupos CMS e LPS+CMS receberam 30 mg/kg do animal pela via oral, começando 3 dias antes da injeção de LPS. Os grupos controle (CTL) e LPS receberam o veículo (óleo de amendoim) sem o composto CMS121. Gráficos mostrando os valores individuais, a média dos valores e o desvio padrão positivo. (n=8-10)

## 6. DISCUSSÃO

Durante a primeira etapa, quando testadas as doses repetidas por 7 dias de CMS121 (1, 3 e 10 mg/kg do animal) em animais saudáveis, não houve efeito do CMS121 em nenhum dos testes de comportamento aplicados. A avaliação do comportamento no CA, TSC, TBS e LCE buscava observar comportamentos como do tipo-ansioso, do tipo-depressivo e de anedonia, entretanto o CMS121 não alterou nesses comportamentos. Como a estrutura do CMS121 foi baseado no flavonoide fisetina, o qual apresentou resultados ansiolíticos e antidepressivos (GOPNAR *et al.*, 2023), esperávamos encontrar os mesmos resultados. Há poucos estudos mostrando os efeitos comportamentais do CMS121, principalmente em animais saudáveis. Um levantamento de testes comportamentais em roedores feito em 2022 indica que o comportamento animal ainda não é completamente compreendido, e recomenda que vários testes comportamentais sejam executados para a obtenção de um resultado (ACIKGOZ; DALKIRAN; DAYI,

2022). Isso foi uma limitação dessa etapa, onde os testes que foram feitos para observar o comportamento do tipo ansioso (CA e LCE), do tipo depressivo (TSC) e comportamento de anedonia (TBS) não apresentaram resultados. Outros testes como o labirinto Y, *marble burying*, labirinto aquático de Moris, reconhecimento de objeto e teste do claro e escuro poderiam revelar se o CMS121 possui alguma influência sobre a cognição e ansiedade. Pela razão de todos os testes feitos serem preditivos, com animais saudáveis, os resultados não excluem a possibilidade de que o CMS121 funcione em outro regime de dose ou tratamento, como tratamentos mais longos (3-4 meses) como visto na literatura.

A literatura sobre o CMS121 é baseada em linhagens específicas de camundongos, como camundongos SAMP8 e db/db (CURRAIS *et al.*, 2019; ZAHID *et al.*, 2023). Nesse projeto, trabalhamos com camundongos Swiss sem nenhuma modificação genética. É possível que para que os benefícios do CMS121 possam ser observados, é necessário que doenças metabólicas ou genéticas estejam presentes.

Por outro lado, o fato do CMS121 não alterar o comportamento desses animais saudáveis indica que a molécula não gera toxicidade nos camundongos, sendo então segura para que mais testes sejam realizados.

Os resultados presentes nesse projeto também apresentam uma dispersão maior do que a esperada e vista na literatura. Fatores externos como o barulho e o estado de biotérios e salas especiais para o comportamento animal contribuem para a mudança de comportamento, como o do tipo-depressivo (CHENG *et al.*, 2022), e podem ter contribuído para os resultados inesperados, como os do teste de TSC, onde a dispersão foi muito grande.

Na segunda etapa, quando testadas as duas doses de CMS121 (3 e 10 mg/kg do animal), por meio de injeção *i.p.*, em um modelo de infecção séptica induzida pela bactéria *K.p.* instilada intratraquealmente, observamos a mortalidade de 40%, o que era esperado (BONORINO, 2021). O CMS121 não foi capaz de reverter os efeitos da sepse, uma vez que não protegeu contra a mortalidade e a deterioração da saúde do animal, quando avaliados pelo escore clínico e a perda de peso. Entretanto, houve uma diminuição gradual do consumo de ração acumulada quando comparados os dois grupos que recebam CMS121 e o grupo controle. Isso não é visto em outros estudos que usaram o tratamento de CMS121 e que mediram o consumo de ração durante o experimento (ATES *et al.*, 2020; ZAHID *et al.*, 2023). Não existem dados mostrando a eficiência do CMS121 contra uma infecção aguda como a sepse. A fisetina, composto modelo para síntese do CMS121, está em ensaio clínico para o tratamento de COVID-19 (VERDOORN *et al.*, 2021), por



consequente, acreditávamos que o CMS121 tivesse os mesmos efeitos. Outras doses de CMS121 ou outros regimes, com tratamentos mais longos, podem revelar o efeito protetor do CMS121 nessa doença. São necessários novos experimentos para sanar estas dúvidas.

Na última etapa, quando o CMS121 (30 mg/kg) foi testado pela via oral (ingestão voluntária) em animais saudáveis e em animais que receberam uma dose de LPS (5 mg/kg), observou-se uma diminuição do peso e do consumo de ração nos grupos que receberam o LPS, bem como a piora no estado clínico, quando comparados com o grupo controle. Estes são efeitos esperados do LPS (COONEY; KIMBALL; VARY, 1997). O grupo LPS+CMS teve uma recuperação de peso mais rápida quando comparado ao grupo LPS, e no 6º após a injeção do LPS, os animais do grupo LPS+CMS já tinham recuperado o seu peso, estando próximos do grupo controle, enquanto os animais do grupo LPS possuíam cerca de 6 gramas a menos cada. Em relação ao peso dos animais, também houve um aumento de peso no grupo tratado somente com CMS, em relação ao grupo controle. Enquanto o grupo controle perdeu peso após a injeção de PBS, os animais do grupo CMS conseguiram manter o peso sem alteração. A perda de peso nos animais CTL pode indicar algum tipo de estresse nos animais, o que teria sido neutralizado pelo CMS121, tanto nos animais controles, como nos animais expostos ao LPS. O CMS121 tem apresentado resultados promissores em estudos voltados a diabetes e camundongos obesos db/db, limitando o ganho de peso dos animais obesos (ZAHID *et al.*, 2023). Entretanto, o CMS121 não foi capaz de melhorar os parâmetros de saúde, analisando pelo escore clínico, nem o consumo de água e ração.

Na terceira etapa também houve uma drástica diferença no comportamento no CA, quando analisado 24h após receberem LPS. Com a dose usada (5 mg/kg do animal) o efeito do LPS já pode ser visto um dia após a injeção, como demonstrado por Zhang *et al.*, a distância percorrida no CA já é afetada no primeiro dia após a exposição ao LPS nesta mesma dose (ZHANG *et al.*, 2022). Os grupos que receberam o LPS tiveram pouca mobilidade no CA 24h após a injeção de LPS, enquanto os animais que tiveram o tratamento de CMS121 juntamente com o LPS tiveram um tempo maior de permanência no centro, quando comparados aos animais que receberam apenas o LPS. Esse comportamento está ligado a tendência do comportamento do tipo-ansioso em ficar em áreas mais fechadas, ou perto de paredes, e evitar áreas abertas e iluminadas (BAILEY; CRAWLEY, 2009). Essa proteção do CMS121 contra o comportamento do tipo-ansioso também ocorreu em animais com mutações presentes na DA, onde o CMS121 protegeu

contra comportamento do tipo ansioso no LCE (ATES *et al.*, 2020). Assim como os efeitos ansiolíticos e antidepressivos vistos no tratamento com fisetina (GOPNAR *et al.*, 2023), é possível que o CMS121 possa influenciar no comportamento animal, produzindo um efeito contra o comportamento do tipo-ansioso.

Já no CA realizado 7 dias após o tratamento com LPS, os grupos já encontravam recuperados, aumentaram a sua mobilidade quando comparados aos grupos que não receberam, mostrando uma hiperlocomoção dos grupos que receberam o LPS. Estudos mostram que o CA perde a sua eficácia em repetições em animais saudáveis e animais expostos ao LPS (ENGELAND *et al.*, 2001; SHIEH; YANG, 2020), e os grupos que receberam o LPS estavam com a mobilidade baixa durante o teste de 24h, sem ter a oportunidade de explorar o campo, gerando uma hiperlocomoção durante esse segundo teste. Os tratamentos não tiveram efeito no comportamento no TSC, assim como na primeira etapa, mostrando que o CMS121 não apresentou efeitos antidepressivos.

Com isso, a única etapa que o CMS121 demonstrou efeitos de ajuda na recuperação da infecção foi na terceira etapa, com a recuperação do peso dos animais. Possivelmente com testes comportamentais distribuídos de forma diferentes durante a etapa, como 48 ou 72 horas após a injeção de LPS, seria possível observar efeitos do CMS121 no comportamento animal. A alta dose de LPS utilizada também pode ter mascarado efeitos mais sutis do CMS121.

## 7. CONCLUSÃO

O objetivo desse trabalho foi o de verificar se o tratamento com CMS121 era capaz de modificar comportamentos do tipo-depressivo e tipo-ansioso em camundongos. Foram analisados animais saudáveis, e a recuperação de animais sépticos e infectados pelo LPS. Foi observado também o comportamento desses animais em testes de CA, LCE, TSC e TBS. A hipótese deste trabalho era que, devido os benefícios vistos no flavonoide fisetina no comportamento e animal, e dos benefícios do CMS121 na DA, além das similaridades da DA com o sepse, o CMS121 iria ajudar na recuperação da infecção e proteger contra comportamento do tipo-depressivo e do tipo-ansioso.

Os resultados obtidos durante esse ano de pesquisa não foram conforme o esperado, mas nos auxiliaram na compreensão de alguns pontos. O CMS121 não teve influência na primeira etapa com os animais saudáveis, sendo incapaz de amenizar comportamento do tipo-ansioso e do tipo-depressivo em animais saudáveis. Mesmo em animais saudáveis, os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade no teste TSC, antevendo assim seu potencial para uma droga de tratamento para depressão.

Na segunda etapa, que foi realizada uma simulação de sepse pulmonar, onde os animais receberam injeção da bactéria *K.p.*, os grupos que receberam o tratamento com CMS121 tiveram um menor consumo acumulado de ração, e mesmo assim o peso dos animais contínuo similar aos animais sépticos. Na terceira etapa, onde os animais foram expostos ao LPS, o CMS121 ajudou na recuperação de peso após a infecção de LPS, e influenciou no tempo de permanência no centro do CA. O CMS121 aumentou o tempo no centro do CA, indicando um efeito ansiolítico nos camundongos, porém isso não foi corroborado com mais nenhum resultado.

Ficou claro que o CMS121 não possui efeitos eficazes na proteção de infecções agudas como a da sepse ou a endotoxemia induzida por LPS, ao menos nas condições e doses testadas. A literatura mostra que o CMS121 tem efeito antienvhecimento em camundongos de envelhecimento rápido e em modelos animais de DA. O CMS121 também foi eficaz em aliviar doenças sistêmicas, como diabetes e os danos renais induzidos pela obesidade, entretanto vimos que a sua influência na sepse foi limitada, nas condições testadas. Mesmo apresentando alguns resultados positivos, eles ainda não justificam o investimento em novas pesquisas com o CMS121 nessas condições e doses, como um novo tratamento para a sepse. Talvez utilizando outras formas de tratamento com o CMS121, como o CMS121 aderido a ração do animal como é feito em muito estudos, os resultados poderiam ser mais promissores. Muitos estudos ainda precisam ser produzidos para que os benefícios e mecanismos do CMS121 possam ser melhor entendidos.

## REFERÊNCIAS

ACIKGOZ, Burcu; DALKIRAN, Bahar; DAYI, Ayfer. An overview of the currency and usefulness of behavioral tests used from past to present to assess anxiety, social behavior and depression in rats and mice. **Behavioural Processes**, v. 200, p. 104670, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2022.104670>.

ADAMS, G. Camelia; BALBUENA, Lloyd; MENG, XiangFei; ASMUNDSON, Gordon J. G. When social anxiety and depression go together: A population study of comorbidity and associated consequences. **Journal of Affective Disorders**, v. 206, p. 48–54, 1 dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.07.031>.

AGYAPONG, Belinda; OBUOBI-DONKOR, Gloria; BURBACK, Lisa; WEI, Yifeng. Stress, Burnout, Anxiety and Depression among Teachers: A Scoping Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 17, p. 10706, jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710706>.

ATES, Gamze; GOLDBERG, Joshua; CURRAIS, Antonio; MAHER, Pamela. CMS121, a fatty acid synthase inhibitor, protects against excess lipid peroxidation and inflammation and alleviates cognitive loss in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Redox Biology**, v. 36, p. 101648, 21 jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101648>.

BAILEY, Kathleen R.; CRAWLEY, Jacqueline N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. *In*: BUCCAFUSCO, Jerry J. (org.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. Frontiers in Neuroscience. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

BARROS, Marilisa Berti de Azevedo; LIMA, Margareth Guimarães; MALTA, Deborah Carvalho; SZWARCOWALD, Célia Landmann; AZEVEDO, Renata Cruz Soares de; ROMERO, Dalia; SOUZA JÚNIOR, Paulo Roberto Borges de; AZEVEDO, Luis Otávio; MACHADO, Ísis Eloah; DAMACENA, Giseli Nogueira; GOMES, Crizian Saar; WERNECK, André de Oliveira; SILVA, Danilo Rodrigues Pereira da; PINA, Maria de Fátima de; GRACIE, Renata. Relato de tristeza/depressão, nervosismo/ansiedade e problemas de sono na população adulta brasileira durante a pandemia de COVID-19. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, p. e2020427, 24 ago. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1679-49742020000400018>.

BASAK, Jacob M.; FERREIRO, Aura; COHEN, Lucy S.; SHEEHAN, Patrick W.; NADARAJAH, Collin J.; KANAN, Michael F.; SUKHUM, Kimberley V.; DANTAS, Gautam; MUSIEK, Erik S. Bacterial sepsis increases hippocampal fibrillar amyloid plaque load and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of disease**, v. 152, p. 105292, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105292>.

BEESDO, Katja; KNAPPE, Susanne; PINE, Daniel S. Anxiety and Anxiety Disorders in Children and Adolescents: Developmental Issues and Implications for DSM-V.

**Psychiatric Clinics of North America**, Anxiety Disorders. v. 32, n. 3, p. 483–524, 1 set. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.06.002>.

BLAZER, Dan G. Depression in Late Life: Review and Commentary. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 58, n. 3, p. M249–M265, 1 mar. 2003.

<https://doi.org/10.1093/gerona/58.3.M249>.

BONORINO, Kelly Cattelan. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021

BRENES, Gretchen A. Anxiety, Depression, and Quality of Life in Primary Care Patients. **Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 9, n. 6, p. 437–443, 2007. .

BUCHBERGER, Barbara; HUPPERTZ, Hendrik; KRABBE, Laura; LUX, Beate; MATTIVI, Jessica T.; SIAFARIKAS, Aris. Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis.

**Psychoneuroendocrinology**, v. 70, p. 70–84, ago. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.04.019>.

CALSAVARA, Allan J.; COSTA, Priscila A.; NOBRE, Vandack; TEIXEIRA, Antonio L. Prevalence and risk factors for post-traumatic stress, anxiety, and depression in sepsis survivors after ICU discharge. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 43, p. 269–276, 7 out. 2020. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-0986>.

CAN, Adem; DAO, David T.; TERRILLION, Chantelle E.; PIANTADOSI, Sean C.; BHAT, Shambhu; GOULD, Todd D. The tail suspension test. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 59, p. e3769, 28 jan. 2012. <https://doi.org/10.3791/3769>.

CAO, Chao; YU, Muming; CHAI, Yanfen. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 10, p. 782, 14 out. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2015-1>.

CAROLA, Valeria; D'OLIMPIO, Francesca; BRUNAMONTI, Emiliano; MANGIA, Franco; RENZI, Paolo. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1–2, p. 49–57, 21 ago. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00452-1).

CHAUDHRY, Neera; DUGGAL, Ashish Kumar. Sepsis Associated Encephalopathy. **Advances in Medicine**, v. 2014, p. 762320, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/762320>.

CHENG, Yuan; WANG, Xiaoxuan; YU, Yinghua; GU, Jingxue; ZHAO, Maofang; FU, Qian; SONG, Yilin; LIU, Yi. Noise Induced Depression-Like Behavior, Neuroinflammation and Synaptic Plasticity Impairments: The Protective Effects of

Luteolin. **Neurochemical Research**, v. 47, n. 11, p. 3318–3330, nov. 2022.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-022-03683-0>.

CHIRUTA, Chandramouli; SCHUBERT, David; DARGUSCH, Richard; MAHER, Pamela. Chemical Modification of the Multi-Target Neuroprotective Compound Fisetin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 378–389, 12 jan. 2012.  
<https://doi.org/10.1021/jm2012563>.

COONEY, R. N.; KIMBALL, S. R.; VARY, T. C. Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis: mechanisms and mediators. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 7, n. 1, p. 1–16, jan. 1997. <https://doi.org/10.1097/00024382-199701000-00001>.

CROCQ, Marc-Antoine. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 319–325, set. 2015. .

CRYAN, John F.; MOMBÉREAU, Cedric; VASSOUT, Annick. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Animal Models of Depression and Antidepressant Activity. v. 29, n. 4, p. 571–625, 1 jan. 2005.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.009>.

CURRAIS, Antonio; HUANG, Ling; GOLDBERG, Joshua; PETRASCHECK, Michael; ATES, Gamze; PINTO-DUARTE, António; SHOKHIREV, Maxim N; SCHUBERT, David; MAHER, Pamela. Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging. **eLife**, v. 8, p. e47866, 19 nov. 2019. <https://doi.org/10.7554/eLife.47866>.

DAL-PIZZOL, Felipe; DE MEDEIROS, Gabriela Ferreira; MICHELS, Monique; MAZERAUD, Aurélien; BOZZA, Fernando Augusto; RITTER, Cristiane; SHARSHAR, Tarek. What Animal Models Can Tell Us About Long-Term Psychiatric Symptoms in Sepsis Survivors: a Systematic Review. **Neurotherapeutics**, v. 18, n. 2, p. 1393–1413, 1 abr. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00981-9>.

DAVIS, Randall L.; STEVENS, Craig W.; THOMAS CURTIS, J. The opioid antagonist,  $\beta$ -funaltrexamine, inhibits lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and reduces sickness behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v. 173, p. 52–60, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.037>.

DEACON, Robert M. J. Assessing nest building in mice. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1117–1119, 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>.

DOMINGUES, Micaela; CASARIL, Angela Maria; SMANIOTTO, Thiago Ângelo; BIRMANN, Paloma Taborda; LOURENÇO, Darling de Andrade; BAMPI, Suely Ribeiro; VIEIRA, Beatriz; LENARDÃO, Eder João; SAVEGNAGO, Lucielli. Selanylimidazopyridine abolishes inflammation- and stress-induced depressive-like behaviors by modulating the oxido-nitrosative system. **European Journal of**

**Pharmacology**, v. 914, p. 174570, 5 jan. 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174570>.

ENGELAND, Christopher G; NIELSEN, Daniel V; KAVALIERS, Martin; OSSENKOPP, Klaus-Peter. Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 72, ed. 4, p. 481-491, Março 2001. DOI [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00436-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00436-4). Disponível em: Acesso em: 28 out. 2023.

GAITERI, C.; DING, Y.; FRENCH, B.; TSENG, G. C.; SIBILLE, E. Beyond modules and hubs: the potential of gene coexpression networks for investigating molecular mechanisms of complex brain disorders. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 13, n. 1, p. 13–24, jan. 2014. <https://doi.org/10.1111/gbb.12106>.

GONÇALVES, Muryel Carvalho; HOREWICZ, Verônica Vargas; LÜCKEMEYER, Débora Denardin; PRUDENTE, Arthur Silveira; ASSREUY, Jamil. Experimental Sepsis Severity Score Associated to Mortality and Bacterial Spreading is Related to Bacterial Load and Inflammatory Profile of Different Tissues. **Inflammation**, v. 40, n. 5, p. 1553–1565, out. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0596-3>.

GOPNAR, Vitthal V.; RAKSHIT, Debarati; BANDAKINDA, Mounisha; KULHARI, Uttam; SAHU, Bidya Dhar; MISHRA, Awanish. Fisetin attenuates arsenic and fluoride subacute co-exposure induced neurotoxicity via regulating TNF- $\alpha$  mediated activation of NLRP3 inflammasome. **NeuroToxicology**, v. 97, p. 133–149, 1 jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.06.006>.

GRAM, Aykut; KOWALEWSKI, Mariusz P. Molecular Mechanisms of Lipopolysaccharide (LPS) Induced Inflammation in an Immortalized Ovine Luteal Endothelial Cell Line (OLENDO). **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 3, p. 99, 24 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030099>.

GU, Xiaoying; ZHOU, Fei; WANG, Yeming; FAN, Guohui; CAO, Bin. Respiratory viral sepsis: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment. **European Respiratory Review**, v. 29, n. 157, seç. Reviews, 30 set. 2020. DOI 10.1183/16000617.0038-2020. Disponível em: <https://err.ersjournals.com/content/29/157/200038>. Acesso em: 30 set. 2023.

HARE, David L.; TOUKHSATI, Samia R.; JOHANSSON, Peter; JAARSMA, Tiny. Depression and cardiovascular disease: a clinical review. **European Heart Journal**, v. 35, n. 21, p. 1365–1372, 1 jun. 2014. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh462>.

HINZ, Andreas; HERZBERG, Philipp Yorck; LORDICK, Florian; WEIS, Joachim; FALLER, Hermann; BRÄHLER, Elmar; HÄRTER, Martin; WEGSCHEIDER, Karl; GEUE, Kristina; MEHNERT, Anja. Age and gender differences in anxiety and

depression in cancer patients compared with the general population. **European Journal of Cancer Care**, v. 28, n. 5, p. e13129, 2019. <https://doi.org/10.1111/ecc.13129>.

HOHLS, Johanna Katharina; KÖNIG, Hans-Helmut; QUIRKE, Eleanor; HAJEK, André. Anxiety, Depression and Quality of Life—A Systematic Review of Evidence from Longitudinal Observational Studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 22, p. 12022, 16 nov. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph182212022>.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE (ILAS). Programa de melhoria de qualidade: protocolos gerenciados de sepsis. Relatório Nacional do ano de 2019.

ISHII, Toshiaki; ITOU, Takuya; NISHIMURA, Masakazu. Comparison of growth and exploratory behavior in mice fed an exclusively milk formula diet and mice fed a food-pellet diet post weaning. **Life Sciences**, v. 78, n. 2, p. 174–179, 26 nov. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.041>.

KAIDANOVICH-BEILIN, Oksana; LIPINA, Tatiana; VUKOBRADOVIC, Igor; RODER, John; WOODGETT, James R. Assessment of Social Interaction Behaviors. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 48, p. 2473, 25 fev. 2011. <https://doi.org/10.3791/2473>.

KHAN, Naghma; SYED, Deebea N.; AHMAD, Nihal; MUKHTAR, Hasan. Fisetin: A Dietary Antioxidant for Health Promotion. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, n. 2, p. 151–162, 10 jul. 2013. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4901>.

KÖNIG, H.; KÖNIG, H.-H.; KONNOPKA, A. The excess costs of depression: a systematic review and meta-analysis. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 29, p. e30, 5 abr. 2019. <https://doi.org/10.1017/S2045796019000180>.

LI, Rongqing; LI, Xueqin; ZHAO, Jie; MENG, Fandong; YAO, Chen; BAO, Ensi; SUN, Na; CHEN, Xin; CHENG, Wanpeng; HUA, Hui; LI, Xiangyang; WANG, Bo; WANG, Hui; PAN, Xiucheng; YOU, Hongjuan; YANG, Jing; IKEZOE, Takayuki. Mitochondrial STAT3 exacerbates LPS-induced sepsis by driving CPT1a-mediated fatty acid oxidation. **Theranostics**, v. 12, n. 2, p. 976–998, 1 jan. 2022. <https://doi.org/10.7150/thno.63751>.

LI, Weifen; ALI, Tahir; HE, Kaiwu; LIU, Zizhen; SHAH, Fawad Ali; REN, Qingguo; LIU, Yan; JIANG, Anlong; LI, Shupeng. Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 92, p. 10–24, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.008>.

LIEBERKNECHT, Vicente; CUNHA, Mauricio Peña; JUNQUEIRA, Stella Célio; COELHO, Igor dos Santos; SOUZA, Luiz Felipe de; SANTOS, Adair Roberto Soares dos; RODRIGUES, Ana Lúcia S.; DUTRA, Rafael Cypriano; DAFRE, Alcir Luiz. Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of



depression. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 320, p. 365-373, 1 mar. 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.007>. Acesso em: 28 out. 2023.

LOBO, Suzana Margareth; REZENDE, Ederlon; MENDES, Ciro Leite; DE OLIVEIRA, Mirella Cristinne. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the Brazilian ICUs project. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 1, p. 1–4, 2019. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20190008>.

MA, Wei; AO, Shengxiang; ZHOU, Jianping; LI, Jiabin; LIANG, Xin; YANG, Xue; ZHANG, Hao; LIU, Boyang; TANG, Wanqi; LIU, Haoru; XIAO, Hongyan; LIANG, Huaping; YANG, Xia. Methylsulfonylmethane protects against lethal dose MRSA-induced sepsis through promoting M2 macrophage polarization. **Molecular Immunology**, v. 146, p. 69–77, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.04.001>.

MAHER, Pamela; CURRAIS, Antonio; SCHUBERT, David. Using the Oxytosis/Ferroptosis Pathway to Understand and Treat Age-Associated Neurodegenerative Diseases. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 12, p. 1456–1471, 17 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.10.010>.

MARWOOD, Lindsey; WISE, Toby; PERKINS, Adam M.; CLEARE, Anthony J. Meta-analyses of the neural mechanisms and predictors of response to psychotherapy in depression and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 95, p. 61–72, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.09.022>.

MEI, Bin; LI, Jun; ZUO, Zhiyi. Dexmedetomidine attenuates sepsis-associated inflammation and encephalopathy via central  $\alpha 2A$  adrenoceptor. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 91, p. 296–314, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.008>.

MERCEDES, Bruna Paiva Do Carmo; NUNES DA SILVA, Everton; CARREGARO, Rodrigo Luiz; MIASSO, Adriana Inocenti. Economic burden of depression in Brazil: a cost-of-illness study based on productivity losses and healthcare costs between 2010 to 2018. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 23, n. 2, p. 181–189, fev. 2023. <https://doi.org/10.1080/14737167.2023.2154659>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Depressão. 2023. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/depressao/depressao>. Acesso em: 22 set. 2023.

NAMIKAWA, Hiroki; NIKI, Makoto; NIKI, Mamiko; OINUMA, Ken-Ichi; YAMADA, Koichi; NAKAIE, Kiyotaka; TSUBOUCHI, Taishi; TOCHINO, Yoshihiro; TAKEMOTO, Yasuhiko; KANEKO, Yukihiro; KAKEYA, Hiroshi; SHUTO, Taichi. Siderophore production as a biomarker for *Klebsiella pneumoniae* strains that cause sepsis: A pilot study. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi**, v. 121, n. 4, p. 848–855, abr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2021.06.027>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Depressive disorder (depression). 31 mar. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso em: 22 set. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Mental disorders. 8 jun. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>. Acesso em: 22 set. 2023.

PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY. **CMS-121 by Virogenics for Alzheimer's Disease: Likelihood of Approval**. 26 fev. 2023. **Pharmaceutical Technology**. Disponível em: <https://www.pharmaceutical-technology.com/data-insights/cms-121-virogenics-alzheimer-s-disease-likelihood-of-approval/>. Acesso em: 13 set. 2023.

PRIOR, Marguerite; CHIRUTA, Chandramouli; CURRAIS, Antonio; GOLDBERG, Josh; RAMSEY, Justin; DARGUSCH, Richard; MAHER, Pamela A.; SCHUBERT, David. Back to the Future with Phenotypic Screening. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 503–513, 23 maio 2014. <https://doi.org/10.1021/cn500051h>.

RELLO, Jordi; VALENZUELA-SÁNCHEZ, Francisco; RUIZ-RODRIGUEZ, Maria; MOYANO, Silvia. Sepsis: A Review of Advances in Management. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 11, p. 2393–2411, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0622-8>.

RIBEIRO, Ângela; RIBEIRO, João P.; VON DOELLINGER, Orlando. Depression and psychodynamic psychotherapy. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 40, n. 1, p. 105–109, 12 jun. 2017. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2016-2107>.

RITTIRSCH, Daniel; HUBER-LANG, Markus S; FLIERL, Michael A; WARD, Peter A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214>.

SEIBENHENER, Michael L.; WOOTEN, Michael C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 96, p. e52434, 6 fev. 2015. <https://doi.org/10.3791/52434>.

SHIEH, Kun-Ruey; YANG, Shu-Chuan. Formosan wood mice (*Apodemus semotus*) exhibit more exploratory behaviors and central dopaminergic activities than C57BL/6 mice in the open field test. **Chinese Journal of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 27, 1 jan. 2020. [https://doi.org/10.4103/CJP.CJP\\_47\\_19](https://doi.org/10.4103/CJP.CJP_47_19).

SHOJI, Hirotaka; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. **Neuropsychopharmacology Reports**, v. 39, n. 2, p. 100–118, 27 fev. 2019. <https://doi.org/10.1002/npr2.12052>.

SILVA, Ana Thais Araújo. 95 f. Tese (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SINGER, Mervyn; DEUTSCHMAN, Clifford S.; SEYMOUR, Christopher Warren; SHANKAR-HARI, Manu; ANNANE, Djillali; BAUER, Michael; BELLOMO, Rinaldo; BERNARD, Gordon R.; CHICHE, Jean-Daniel; COOPERSMITH, Craig M.; HOTCHKISS, Richard S.; LEVY, Mitchell M.; MARSHALL, John C.; MARTIN, Greg S.; OPAL, Steven M.; RUBENFELD, Gordon D.; VAN DER POLL, Tom; VINCENT, Jean-Louis; ANGUS, Derek C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 23 fev. 2016. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.

SIVERTSEN, Heidi; BJØRKLØF, Guro Hanevold; ENGEDAL, Knut; SELBÆK, Geir; HELVIK, Anne-Sofie. Depression and Quality of Life in Older Persons: A Review. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 40, n. 5–6, p. 311–339, 12 set. 2015. <https://doi.org/10.1159/000437299>.

SORDI, Regina; MENEZES-DE-LIMA, Octávio; DELLA-JUSTINA, Ana M.; REZENDE, Edir; ASSREUY, Jamil. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **Wiley**, [s. l.], 27 fev. 2013. DOI <https://doi.org/10.1111/iep.12016>.

TILLER, John W G. Depression and anxiety. **Medical Journal of Australia**, v. 199, n. S6, p. S28–S31, 2013. <https://doi.org/10.5694/mja12.10628>.

URANGA-MURILLO, Iratxe; TAPIA, Elena; GARZÓN-TITUAÑA, Marcela; RAMIREZ-LABRADA, Ariel; SANTIAGO, Llipsy; PESINI, Cecilia; ESTEBAN, Patricia; ROIG, Francisco J; GALVEZ, Eva M; BIRD, Phillip I; PARDO, Julián; ARIAS, Maykel. Biological relevance of Granzymes A and K during E. coli sepsis. **Theranostics**, v. 11, n. 20, p. 9873–9883, 17 out. 2021. <https://doi.org/10.7150/thno.59418>.

VANHOOREN, Valerie; LIBERT, Claude. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. **Ageing Research Reviews**, Special Issue: Invertebrate Models of Aging. v. 12, n. 1, p. 8–21, 1 jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.010>.

VERDOORN, Brandon P.; EVANS, Tamara K.; HANSON, Gregory J.; ZHU, Yi; LANGHI PRATA, Larissa G. P.; PIGNOLO, Robert J.; ATKINSON, Elizabeth J.; WISSLER-GERDES, Erin O.; KUCHEL, George A.; MANNICK, Joan B.; KRITCHEVSKY, Stephen B.; KHOSLA, Sundeep; RIZZA, Stacey A.; WALSTON, Jeremy D.; MUSI, Nicolas; LIPSITZ, Lewis A.; KIEL, Douglas P.; YUNG, Raymond; LEBRASSEUR, Nathan K.; ... KIRKLAND, James L. Fisetin for COVID-19 in skilled nursing facilities: Senolytic trials in the COVID era. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 69, n. 11, p. 3023–3033, nov. 2021. <https://doi.org/10.1111/jgs.17416>.

WALF, Alicia A.; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.

WANG, Chunyan; YUAN, Wenlin; HU, Anmin; LIN, Juan; XIA, Zhengyuan; YANG, Catherine F.; LI, Yalan; ZHANG, Zhongjun. Dexmedetomidine alleviated sepsis-induced myocardial ferroptosis and septic heart injury. **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 1, p. 175–184, jul. 2020. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11114>.

WILLNER, Paul. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005. <https://doi.org/10.1159/000087097>.

WOLGENSINGER, Laure. Cognitive behavioral group therapy for anxiety: recent developments. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 347–351, set. 2015. .

ZAHID, Saadia; DAFRE, Alcir L.; CURRAIS, Antonio; YU, Jingting; SCHUBERT, David; MAHER, Pamela. The Geroprotective Drug Candidate CMS121 Alleviates Diabetes, Liver Inflammation, and Renal Damage in db/db Leptin Receptor Deficient Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6828, 6 abr. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24076828>.

ZHANG, Jing; XUE, Bing; JING, Bin; TIAN, Huiling; ZHANG, Naiwen; LI, Mengyuan; LU, Lihua; CHEN, Lin; DIAO, Huaqiong; CHEN, Yufei; WANG, Min; LI, Xiaoli. LPS activates neuroinflammatory pathways to induce depression in Parkinson's disease-like condition. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.961817>. Acesso em: 30 set. 2023.

## ANEXO 1



Comissão de Ética no  
Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do exercício físico sobre a pneumosepse em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 3550051019 <sup>(ID 001488)</sup>, sob a responsabilidade de **Alcir Luiz Dafre e equipe; Gisele Henrique Cardoso Martins; Abel Freitas Garcia; Barbara Dos Santos; Deborah de Camargo Hizume Kunzler; Kelly Cattelan Bonorino; Alice Henrique dos Santos Sumar; Jéssica Jorge Probst** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 17/12/2019.

We certify that the proposal "Effects of physical exercise on pneumosepsis in mice", utilizing 1192 Heterogenics mice (1192 males), protocol number CEUA 3550051019 <sup>(ID 001488)</sup>, under the responsibility of **Alcir Luiz Dafre and team; Gisele Henrique Cardoso Martins; Abel Freitas Garcia; Barbara Dos Santos; Deborah de Camargo Hizume Kunzler; Kelly Cattelan Bonorino; Alice Henrique dos Santos Sumar; Jéssica Jorge Probst** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/17/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2020](#) a [09/2024](#)

Área: [Bioquímica](#)

Origem: [CCB - Biotério de Roedores e animais aquáticos do Labdef](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [1192](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [40 a 50 g](#)

Local do experimento: Departamento de Bioquímica,  
CCB, UFSC

Florianópolis, 17 de dezembro de 2019

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Santa Catarina

Universidade Federal de Santa Catarina