

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de Mestrado

**Efeito do tipo antidepressivo de uma 1,2,3-triazol-acetofenona em
camundongos: evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico**

Marcelo Heinemann Presa

Pelotas, 2023.

Marcelo Heinemann Presa

Efeito do tipo antidepressivo de uma 1,2,3-triazol-acetofenona em camundongos: evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: César Augusto Brüning

Coorientadora: Cristiani Folharini Bortolatto

Pelotas, 2023.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P928e Presa, Marcelo Heinemann

Efeito do tipo antidepressivo de uma 1,2,3-triazo-
-acetofenona em camundongos : evidências do
envolvimento do sistema serotoninérgico / Marcelo
Heinemann Presa ; César Augusto Brüning, orientador ;
Cristiani Folharini Bortolatto, coorientadora. — Pelotas,
2023.

114 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Bioquímica e Bioprospecção,
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de
Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. 1,2,3-triazol. 2. Acetofenona. 3. Antidepressivo. 4.
Depressão. 5. Sistema serotoninérgico. I. Brüning, César
Augusto, orient. II. Bortolatto, Cristiani Folharini, coorient.
III. Título.

CDD : 616.8528

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

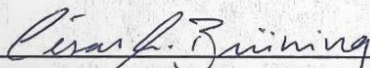
Marcelo Heinemann Presa

Efeito do tipo antidepressivo de uma 1,2,3-triazol-acetofenona em camundongos: evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

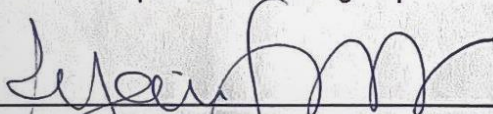
Data de Defesa: 28 de fevereiro de 2023

Banca Examinadora:



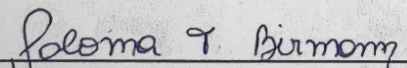
Prof. Dr. César Augusto Brüning (Orientador) – Presidente

Doutor em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria



Profa. Dra. Rejane Giacomelli Tavares

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Profa. Dra. Paloma Taborda Birmann

Doutora em Ciências (Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedicado à Berenice, minha filha de quatro patas e amor da minha
vida, que esteve presente dando amor e carinho durante toda a
elaboração desta Dissertação.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu companheiro de vida, Romualdo, por estar sempre presente com um sorriso e o abraço mais aconchegante e acolhedor desse mundo. Obrigado por nunca medir esforços para me acolher nos momentos difíceis (que não foram poucos) e por nunca soltar a minha mão. Nossa família é tudo para mim. Eu te amo!

À minha mãe, Magna, por fazer o possível e o impossível por mim, sempre me incentivando a estudar e seguir meus sonhos. Obrigado pelo carinho e amor incondicional que sempre me foi dado.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Camila, pelo companheirismo e por, mesmo distantes, sempre se fazerem presentes arrancando um sorriso e aquecendo meu coração.

Ao meu pai, Rene, por tornar possível boa parte do caminho até aqui.

Aos Enzos da velha guarda, Marcelo, Rodrigo e Rafa, pela amizade e por tornar esta jornada mais leve com jogatinas, conversas aleatórias e muitos momentos de diversão, presenciais e virtuais.

Aos meus guias que tornaram tudo isto possível, por estarem sempre ao meu lado me amparando e trazendo a proteção necessária em cada momento da vida.

Ao meu orientador, César, pela paciência e confiança em mim depositada. Obrigado por me lembrar que ainda existem excelentes professores e por te tornares minha inspiração profissional.

À minha coordenadora, Cris, por todo apoio e conhecimento compartilhado. És, assim como o César, um exemplo de profissionalismo.

Aos colegas do LABIONEM pelas conversas e momentos compartilhados. Em especial à Marcia que, além de colega, se tornou uma amiga e sempre me incentivou a seguir firme e ser melhor a cada dia.

A todos aqui mencionados, meu muito obrigado! Esta dissertação tem muito de cada um de vocês.

“Você tem poder sobre sua mente – não sobre eventos externos. Perceba isso e você encontrará a sua força.”
– Marco Aurélio.

RESUMO

PRESA, Marcelo Heinemann. Efeito do tipo antidepressivo de uma 1,2,3-triazol-acetofenona em camundongos: evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico. 2023. 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A depressão é um transtorno psiquiátrico que está presente na vida de milhões de pessoas. Apesar de existirem diversas classes de antidepressivos atualmente, grande parte dos indivíduos deprimidos não apresentam alívio dos sintomas com o tratamento, mostrando a necessidade do desenvolvimento de novos antidepressivos. Nos últimos anos, os compostos N-heterocíclicos triazóis vêm sendo estudados por apresentarem propriedades farmacológicas interessantes, como anti-inflamatória, anticonvulsivante e antidepressiva. Os 1,2,3-triazol têm apresentado mecanismos semelhantes aos encontrados nos antidepressivos conhecidos e utilizados como primeira linha para o tratamento da depressão. A partir disso, foram sintetizadas moléculas híbridas inéditas de 1,2,3-triazol-acetofenonas e avaliada a atividade de inibição da monoamina oxidase (MAO) *in silico* e *in vitro*. Com base nos dados obtidos, selecionamos a molécula com resultados mais promissores para dar sequência na avaliação da atividade antidepressiva em estudos *in vivo*. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tipo antidepressivo da 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1H-1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona (ETAP), um composto híbrido contendo 1,2,3-triazol e acetofenona, em camundongos, utilizando dois testes comportamentais para a avaliação do comportamento tipo depressivo, o teste do nado forçado e teste de suspensão pela cauda. Para avaliar o efeito do tipo antidepressivo da ETAP (0,5, 1 e 5 mg/kg, via intragástrica (i.g.)) a mesma foi administrada 30 minutos antes dos testes comportamentais para avaliação do comportamento depressivo e apresentou aumento no tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade com redução no tempo de imobilidade total, caracterizando o efeito do tipo antidepressivo. Além deste efeito, o estudo pretendeu avaliar o envolvimento do sistema serotoninérgico para a ação do tipo antidepressiva da ETAP. Para avaliar a contribuição deste sistema, avaliamos a necessidade do sistema de forma íntegra para a ação do tipo antidepressiva da ETAP com o pré-tratamento com *p*-clorofenilalanina, um inibidor da enzima responsável pela conversão de triptofano em serotonina. Nossos resultados demonstraram que o efeito do tipo antidepressivo da ETAP é dependente de serotonina. Além disto, avaliamos, também, o envolvimento dos receptores deste sistema neste efeito. Para isto, os antagonistas específicos dos receptores serotoninérgicos WAY100635, Cetanserina, Ondansetrona e GR113808 foram pré-administrados para avaliar o envolvimento dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ e 5-HT₄, respectivamente. Nossas análises mostraram um envolvimento dos receptores 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₄ no efeito do tipo antidepressivo da ETAP. Anterior aos testes comportamentais que avaliam o comportamento depressivo, foi realizado o teste do campo aberto a fim de descartar um possível déficit locomotor nos animais com o tratamento de ETAP. Os resultados demonstram que a administração de ETAP não altera as atividades locomotora e exploratória dos animais. Ademais, a toxicidade da ETAP foi avaliada e demonstramos que o tratamento com esta molécula não apresentou sinais de toxicidade. Desta forma, este estudo

identificou uma nova droga com potencial efeito antidepressivo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a depressão.

Palavras-chave: 1,2,3-triazol; acetofenona; antidepressivo; depressão; sistema serotoninérgico.

ABSTRACT

PRESA, Marcelo Heinemann. Antidepressant like effect of a 1,2,3-triazole-acetophenone in mice: evidence of involvement of the serotonergic system. 2023. 114 f. Dissertation (master's degree in Biochemistry and Bioprospecting) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Depression is a psychiatric disorder that affects millions of people. Despite the existence of various classes of antidepressants, a large proportion of depressed individuals do not experience symptom relief with treatment, highlighting the need for the development of new antidepressants. In recent years, N-heterocyclic triazole compounds have been studied for their interesting pharmacological properties, such as anti-inflammatory, anticonvulsant, and antidepressant effects. 1,2,3-triazoles have been shown to have similar mechanisms to those found in known antidepressants used as first-line treatments for depression. Based on this, novel hybrid molecules of 1,2,3-triazole-acetophenones were synthesized and their inhibition activity of monoamine oxidase (MAO) was evaluated *in silico* and *in vitro*. Based on the data obtained, we selected the molecule with the most promising results to proceed with evaluating its antidepressant-like activity in *in vivo* studies. The objective of this study was to evaluate the antidepressant-like effect of 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethanone (ETAP), a hybrid compound containing 1,2,3-triazole and acetophenone, in mice, using two behavioral tests for evaluating depressive-like behavior: the forced swim test and tail suspension test. To evaluate the antidepressant effect of ETAP (0.5, 1, and 5 mg/kg, i.g.), it was administered 30 minutes before the behavioral tests to evaluate depressive-like behavior, and it showed an increase in the latency time for the first episode of immobility with a reduction in the total immobility time, characterizing the antidepressant-like effect. In addition to this effect, the study aimed to evaluate the involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like action of ETAP. To evaluate the contribution of this system, we assessed the need for an intact system for the antidepressant-like action of ETAP by pretreating the mice with *p*-chlorophenylalanine, an enzyme inhibitor responsible for converting tryptophan to serotonin. Our results showed that the antidepressant-like effect of ETAP is serotonin dependent. We also evaluated the involvement of the receptors of this system in this effect. For this, specific antagonists of serotonin receptors, WAY100635, ketanserin, ondansetron, and GR113808, were pre-administered to evaluate the involvement of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃, and 5-HT₄ receptors, respectively. Our analyses showed involvement of 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₄ receptors in the antidepressant-like effect of ETAP. Prior to the behavioral tests evaluating depressive-like behavior, the open field test was performed to exclude a possible locomotor deficit in the animals with ETAP treatment. The results demonstrate that the administration of ETAP does not alter the locomotor and exploratory activities of the animals. Additionally, the toxicity of ETAP was evaluated, and we demonstrated that treatment with this molecule did not show signs of toxicity. Thus, this study identified a new drug with potential antidepressant effects for the development of therapeutic strategies for depression.

Keywords: 1,2,3-triazole; acetophenone; antidepressant; depression; serotonergic system.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Estrutura das principais monoaminas biológicas.....	27
Figura 2. Fisiopatologia da depressão conforme a teoria monoaminérgica	28
Figura 3. Local de síntese e distribuição de serotonina no SNC	31
Figura 4. Biossíntese, armazenamento e liberação de serotonina no SNC	32
Figura 5. Esquema geral do funcionamento dos receptores neurais.....	34
Figura 6. Biossíntese, armazenamento, liberação e interação de serotonina com seus receptores pré-sinápticos e pós-sinápticos.....	37
Figura 7. Transporte de serotonina por SERT: rearmazenamento e degradação	39
Figura 8. Reação de degradação de serotonina sob ação da enzima MAO ...	40
Figura 9. Ilustração da neurotransmissão serotoninérgica	42
Figura 10. Mecanismo de ação das principais classes de antidepressivos.....	45
Figura 11. Estrutura dos triazóis.....	48
Figura 12. Estrutura da acetofenona	50
Figura 13. Estrutura da Bupropiona com a porção acetofenona em destaque	51
Figura 14. Estrutura da 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona	52
Figura 15. Ilustração do Teste de Suspensão pela Cauda e do Teste do Nado Forçado	56
Figura 16. Ilustração do Teste do Campo Aberto	57

Artigo Científico

Figure 1. Chemical structure of ETAP	62
Figure 2. ETAP dose-response curve in the FST	63
Figure 3. ETAP dose-response curve in the TST	64

Figure 4. Effect of <i>p</i> -CPA on the antidepressant like action of ETAP in the TST	68
Figure 5. Effect of WAY100635 on the antidepressant like action of ETAP in the TST	69
Figure 6. Effect of ketanserin on the antidepressant like action of ETAP in the TST	71
Figure 7. Effect of ondansetron on the antidepressant like action of ETAP in the TST	73
Figure 8. Effect of GR113808 on the antidepressant like action of ETAP in the TST	74
Figure 9. General toxicity parameters in female mice exposed to a single dose of ETAP	78
Figure 10. Illustration of the experimental design for constructing the dose-response curve in the FST and TST.....	81
Figure 11. Illustration of the experimental design for the evaluation of the involvement of the serotonergic system in the antidepressant action of ETAP	82

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Critérios para o diagnóstico de depressão	24
--	----

Artigo Científico

Table 1. Effects of different doses of ETAP in the OFT	65
Table 2. Effects of ETAP and/or <i>p</i> -CPA in the OFT	68
Table 3. Effects of ETAP and/or WAY100635 in the OFT.	70
Table 4. Effects of ETAP and/or ketanserin in the OFT	71
Table 5. Effects of ETAP and/or ondansetron in the OFT.	73
Table 6. Effects of ETAP and/or GR113808 in the OFT	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Revisão Bibliográfica

5-HIAA	5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina / serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AADC	L-aminoácido aromático descarboxilase
ADT	Antidepressivos tricíclicos
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DA	Dopamina
DAG	Diacil glicerol
DSM-5-TR	Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais – 5ª Edição
ETAP	1-(2-(4-(4-etilfenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona
FAD	Dinucleotídeo flavina adenina
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IMAO	Inibidor da monoamina oxidase
IP3	Inositol trifosfato
IRDN	Inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina
IRSN	Inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina
ISRN	Inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LASOL	Laboratório de Síntese Orgânica Limpa
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO	Monoamina oxidase
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLC	Fosfolipase C
SERT	Transportador de serotonina

SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Teste do Nado Forçado
TPH	Triptofano hidroxilase
TSC	Teste de Suspensão pela Cauda
UCMS	Estresse leve crônico e imprevisível
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

Artigo Científico

ALT	Alanine Aminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartate Aminotransferase
CMC	Carboxymethyl cellulose
CNS	Central Nervous System
ETAP	1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one
FST	Forced Swimming Test
i.e.	<i>id est</i> – that is
i.g.	Intragastric
i.p.	Intraperitoneal
MAO	Monoamine Oxidase
MAOI	Monoamine Oxidase Inhibitors
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OFT	Open Field Test
p-CPA	<i>p</i> -chlorophenylalanine
s.c.	Subcutaneous
S.E.M.	Standard Error of the Mean
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
TST	Tail Suspension Test

LISTA DE SÍMBOLOS

Revisão Bibliográfica

>	Maior
—	Inibição
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
<i>Gi</i>	Proteína G inibitória de AMPc
<i>Gs</i>	Proteína G estimulatória de AMPc
<i>Gq</i>	Proteína G estimulatória de PLC
Na^+	Íon sódio
K^+	Íon potássio
Ca^{2+}	Íon cálcio
Cl^-	Íon cloro
$\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ ATPase}$	Bomba sódio/potássio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{OH}^\bullet$	Radical hidroxila
(<i>RS</i>)	Configuração de enantiômero
N	Nitrogênio
C	Carbono
H	Hidrogênio

Artigo Científico

%	Percentage
mg/kg	Milligrams per kilogram
s	Seconds
$\pm$	Plus and minus

*	Significance with the control group
#	Significance with the ETAP group
<	Less than
=	Equal
>	Bigger than
g	Grams
N	Number of animals
°C	Degress celsius
¹³C	Carbon-13
¹H	Hydrogen-1
cm	Centimeter
d	Diameter
l	Litre
h	Height

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Autorização do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFPel para execução deste projeto.

SUMÁRIO

1 Introdução	21
2 Objetivos	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 Revisão da Literatura	24
3.1 Depressão	24
3.2 Teoria Monoaminérgica	26
3.3 Sistema Serotoninérgico.....	29
3.4 Antidepressivos	43
3.5 1,2,3-Triazol.....	47
3.6 Acetofenona.....	49
3.7 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona	51
3.8 Uso de modelos animais e testes comportamentais para depressão	53
4. Manuscrito.....	58
5. Discussão.....	92
6. Conclusão	97
7. Perspectivas.....	98
8. Referências Bibliográficas	99
ANEXO.....	113

1 Introdução

A depressão é um transtorno psiquiátrico comum e de natureza recorrente, que se faz presente na vida de grande parte da população mundial, ocasionando em uma redução na qualidade de vida dos pacientes deprimidos (LI et al., 2021). Apesar de ser considerada a doença do século XXI, a depressão ainda é bastante negligenciada, tendo um baixo índice de procura para diagnósticos e tratamentos, fazendo com que pacientes desenvolvam sintomas cada vez mais graves, podendo, até, desenvolver ideações suicidas e, de fato, cometer suicídio (NOGUEIRA et al., 2018). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que aproximadamente 280 milhões de pessoas são acometidas pela depressão (OMS, 2021).

Embora incessantemente estudada, a fisiopatologia da depressão é bastante complexa e ainda não totalmente elucidada, tendo diversos mecanismos biológicos já conhecidos envolvidos no desenvolvimento deste transtorno (MALHI; MANN, 2018; PEREZ-CABALLERO et al., 2019). Durante décadas, a hipótese monoaminérgica foi a única teoria existente para a explicação desta fisiopatologia e, por conta disto, a regulação da disfunção de monoaminas biológicas a nível cerebral ainda é o mecanismo mais frequentemente utilizado para a síntese de novos fármacos antidepressivos (DA CRUZ et al., 2020; GOULD; ZARATE JR; THOMPSON, 2019; MALHI; MANN, 2018). Diversas são as classes de fármacos antidepressivos comercializados para o tratamento da depressão (COHEN; DERUBEIS, 2018). Porém, como já mencionado, a grande maioria atua na regulação dos níveis de monoaminas biológicas, uma vez que estas moléculas estão envolvidas na regulação de humor, principalmente a serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT) (GOULD; ZARATE JR; THOMPSON, 2019). Infelizmente, aproximadamente 30% dos indivíduos acometidos pela depressão não apresentam resposta às terapias farmacológicas antidepressivas ou apresentam alívio dos sintomas após 4 semanas de tratamento. Estes fatores demonstram a principal problemática dos antidepressivos disponíveis atualmente, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos (MALHI; MANN, 2018).

Os modelos animais se tornaram indispensáveis para o estudo de transtornos psiquiátricos uma vez que permitem a utilização de métodos invasivos e teste de hipóteses direcionadas, fornecendo informações valiosas com relação às alterações neurobiológicas envolvidas com estes transtornos. Ainda, possibilitam a avaliação de atividades biológicas de candidatos a novos fármacos em um organismo semelhante ao organismo humano, permitindo o conhecimento dos mecanismos de ação e possíveis reações adversas antes de serem testadas em humanos (KOLAR et al., 2021; ALEKSANDROVA; WANG; PHILLIPS, 2019).

Nos últimos anos, os compostos N-heterocíclicos triazóis vêm sendo estudados por apresentar propriedades farmacológicas interessantes, como anti-inflamatória, anticonvulsivante e antidepressiva. Os 1,2,3-triazol vêm apresentando mecanismos semelhantes aos encontrados em antidepressivos conhecidos e utilizados como primeira linha para o tratamento da depressão, por inibição da monoamina oxidase (MAO) e inibição da recaptação de 5-HT (COSTA et al., 2021; SINGH et al., 2021). Com base nisto, Costa e colaboradores (2021) sintetizaram moléculas híbridas inéditas de 1,2,3-triazolil-acetofenonas e avaliaram a atividade de inibição da MAO. Os dados *in silico* obtidos demonstraram potencial de inibição da MAO, o qual foi confirmada por análises *in vitro* (COSTA et al., 2021).

Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tipo antidepressivo de 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona (ETAP), molécula com resultado mais eficaz na avaliação de atividade inibitória da MAO avaliada por Costa e colaboradores (2021), em camundongos, utilizando dois testes comportamentais para a avaliação do comportamento depressivo, o Teste do Nado Forçado (TNF) e Teste de Suspensão pela Cauda (TSC). Além da avaliação do efeito do tipo antidepressivo, o estudo pretendeu avaliar o envolvimento do sistema serotoninérgico para a ação da ETAP.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tipo antidepressivo da 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona (ETAP) em camundongos, bem como identificar o envolvimento do sistema serotoninérgico no seu mecanismo de ação.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do tipo antidepressivo da ETAP no Teste do Nado Forçado em camundongos;
- Verificar o efeito do tipo antidepressivo da ETAP no Teste de Suspensão pela Cauda em camundongos;
- Verificar a necessidade da integridade do sistema serotoninérgico na ação do tipo antidepressiva da ETAP frente a um depletor de serotonina;
- Verificar a contribuição do sistema serotoninérgico no efeito do tipo antidepressivo da ETAP frente a pré-administração de antagonistas específicos dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ e 5-HT₄ no Teste de Suspensão pela Cauda;
- Verificar as atividades locomotora e exploratória dos camundongos frente a administração de ETAP e/ou antagonistas específicos dos receptores serotoninérgicos no Teste do Campo Aberto;
- Avaliar a toxicidade oral aguda da ETAP.

3 Revisão da Literatura

3.1 Depressão

A depressão é definida como um transtorno de humor comum, heterogêneo e multifatorial que afeta negativamente os sentimentos das pessoas, tendo como principais sintomas a persistência de sentimentos de tristeza e desesperança (APA, 2022). Estes sintomas reduzem significativamente a qualidade de vida dos pacientes, tornando a depressão um distúrbio altamente incapacitante (OPAS/OMS, 2022). O Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais – 5ª Edição – TR (DSM-5-TR – do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fifth Edition – Text Revision*, publicado pela *American Psychiatric Association*, 2022) descreve que para que haja o diagnóstico de depressão, é necessário que o paciente apresente ao menos cinco dos sintomas característicos (Tabela 1) e que a sintomatologia seja observada ao longo de, pelo menos, duas semanas (APA, 2022).

Tabela 1. Critérios para o diagnóstico de depressão de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais – 5ª Edição – TR (DSM-5-TR).

Sintomas necessários para diagnóstico de depressão (DSM-5-RT)
Humor deprimido na maior parte do dia
Diminuição do interesse ou prazer
Perda ou ganho de peso (>5% de alteração em um mês)
Insônia ou hipersônia
Agitação ou retardo psicomotor
Fadiga ou perda de energia
Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva
Capacidade diminuída para concentrar-se ou pensar
Pensamento recorrente de morte o suicídio

Fonte: traduzido e adaptado de *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fifth Edition – Text Revision* (2022).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021) alega que diagnósticos errôneos aumentam o agravante deste transtorno, uma vez que pacientes deprimidos muitas vezes não são diagnosticados, podendo resultar em sintomas

cada vez mais graves, enquanto pessoas que não apresentam o distúrbio recebem o diagnóstico e a prescrição para o uso de antidepressivos, gerando alterações a nível de Sistema Nervoso Central (SNC) que não seriam necessários nestes pacientes. O aumento da gravidade dos sintomas em um indivíduo deprimido sem diagnóstico pode ocasionar em ideação suicida ou, de fato, levar o paciente a cometer suicídio, o que faz da depressão a segunda maior causa de morte entre pessoas de 15 a 29 anos, resultando em aproximadamente 800 mil suicídios por ano (OPAS/OMS, 2022), e, ainda, uma doença altamente incapacitante (PEREZ-CABALLERO et al., 2019).

A OMS estima que 3,8% da população mundial é afetada pela depressão, totalizando cerca de 280 milhões de pessoas deprimidas (OMS, 2021). A prevalência de diagnóstico é em mulheres, onde se observa um número de 1,5 a 3 vezes do que em homens, e com maior frequência na adolescência ou no período de menopausa (CHAND; ARIF; KUTLENIOS, 2021). Em contrapartida, a taxa de suicídio observada é 3 vezes maior no sexo masculino quando comparado ao sexo feminino (OLIFFE et al., 2019).

Apesar da alta prevalência global da depressão e de se tratar de um transtorno conhecido há décadas, nosso entendimento acerca da sua fisiopatologia ainda é bastante limitado. A depressão é um transtorno multifatorial que apresenta fatores biológicos com grande relevância para sua formação. Diversos relatos ao longo dos anos demonstram que indivíduos com histórico familiar de depressão são mais propensos ao desenvolvimento deste transtorno (NAMKUNG; LEE; SAWA, 2018; PHAM; GARDIER, 2019). Além disto, fatores sociais também apresentam um papel importante no que diz respeito ao desenvolvimento de depressão (CHAND; ARIF; KUTLENIOS, 2021). Como exemplo de fator social podemos descrever o quadro de isolamento social adotado como medida preventiva para a disseminação do vírus COVID-19 durante o momento pandêmico vivido nos anos de 2020 e 2021, onde observamos um aumento de 25% nos casos de depressão ao redor do mundo (OPAS/OMS, 2022). Ademais, alguns estudos apontam que a poluição ambiental também é um fator determinante na depressão uma vez que o aumento de gases tóxicos favorece o processo de estresse oxidativo e

degeneração de neurônios dopaminérgicos, os quais também estão envolvidos com a fisiopatologia deste transtorno (EZE et al., 2020; NUYTS et al., 2019).

Embora o entendimento da patogênese da depressão ainda seja um tanto quanto limitado, o uso de modelos animais nas últimas décadas permitiu um progresso exponencial no que diz respeito ao conhecimento de mecanismos neurobiológicos envolvidos no desenvolvimento deste transtorno (MÉNARD; HODES; RUSSO, 2016). Atualmente, é de conhecimento mundial que nenhum mecanismo sozinho é suficiente para explicar todos os aspectos da depressão. Uma extensa quantidade de pesquisas demonstra diversas evidências para o desenvolvimento de um quadro depressivo, como neuroplasticidade, neuroinflamação, neurogênese, alteração do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), estresse, alteração em sistemas neurais, como o sistema glutamatérgico e sistema de monoaminas, entre outras (DEAN; KESHAVAN, 2017; MÉNARD; HODES; RUSSO, 2016). Entretanto, durante décadas, a hipótese mais amplamente aceita para a explicação da fisiopatologia da depressão foi a teoria monoaminérgica, tendo um maior destaque no papel da 5-HT na resposta antidepressiva (PEREZ-CABALLERO et al., 2019).

3.2 Teoria Monoaminérgica

Os primeiros relatos de estudos referentes a neuroquímica e neurobiologia da depressão datam da década de 1950 e foram iniciados por consequência de efeitos farmacológicos adversos relacionados ao tratamento de outras doenças que alteraram a biodisponibilidade de catecolaminas (PEREZ-CABALLERO et al., 2019). A depleção monoaminérgica gerada pelo tratamento com o anti-hipertensivo reserpina gerou sintomas depressivos em pacientes que não apresentavam o transtorno depressivo anterior à administração deste fármaco (FERRARI; VILLA, 2017). Estes achados sugeriram que a depleção de monoaminas era a alteração responsável pelo desenvolvimento de depressão (PACHER; KECSKEMETI, 2004). Posteriormente, contribuindo com os dados encontrados e dando mais força para a teoria que viria a surgir, pacientes tratados com iproiniazida, um fármaco para tratamento de tuberculose, apresentavam uma melhora de humor e reversão de quadros depressivos, o que

mais adiante foi relacionado a capacidade do fármaco de inibir a MAO, enzima responsável pela degradação de monoaminas biológicas por meio da sua desaminação oxidativa (BASTOS, 2020).

Com os achados supracitados, pesquisadores começaram a descrever a teoria catecolinérgica, que, com a progressão das pesquisas, passou a ser denominada teoria, ou hipótese, monoaminérgica (PEREZ-CABALLERO et al., 2019). Os primeiros relatos desta hipótese datam de 1967 (COPPEN et al., 1967), onde Coppen e colaboradores definiram a etiologia da depressão como sendo um déficit na neurotransmissão de monoaminas biológicas – dopamina (DA), noradrenalina (NA) e 5-HT (Figura 1) – destacando o papel da 5-HT uma vez que este neurotransmissor apresenta relação direta com a regulação de humor.

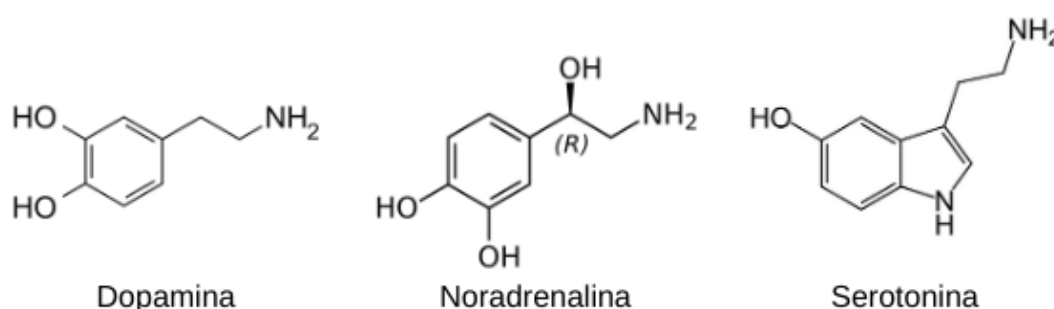


Figura 1. Fórmulas estruturais das principais monoaminas biogênicas relacionadas a teoria monoaminérgica. Fonte: imagens retiradas e adaptadas de www.pt.wikipedia.org acessado em 10 de janeiro de 2023.

Com o passar dos anos, mais observações foram dando suporte à teoria. Assim, inferiu-se que a depressão estaria diretamente associada a um déficit na neurotransmissão de monoaminas (ELHWUEGI, 2004), como demonstrado na Figura 2. Atualmente sabe-se que os níveis de monoaminas no SNC podem ser modificados por diversos fatores como falha no sistema de armazenamento e liberação, síntese prejudicada, ativação excessiva da MAO, falha nos receptores ou sistema de segundos mensageiros, entre outros (ARAÚJO, 2018).

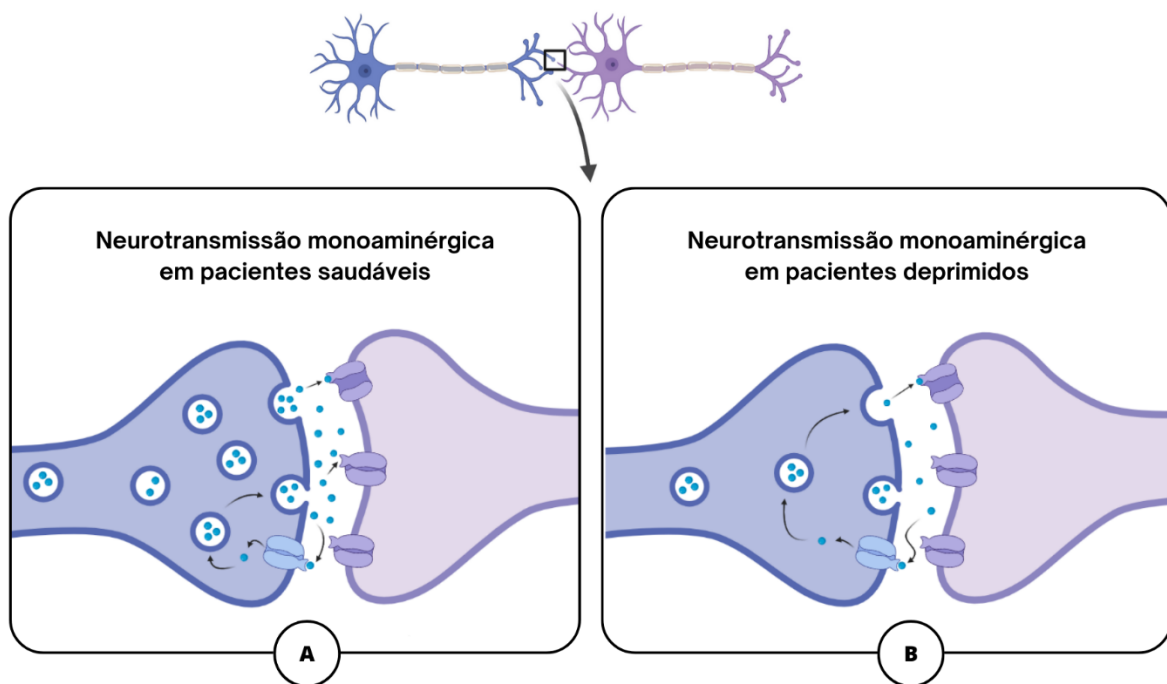


Figura 2. Representação da fisiopatologia da depressão de acordo com a teoria monoaminérgica. A figura **A** demonstra uma neurotransmissão monoaminérgica em um indivíduo saudável, onde a síntese, armazenamento, liberação, ação e recaptação ocorrem de forma normal. A figura **B** demonstra uma transmissão monoaminérgica em um paciente deprimido, onde a neurotransmissão é encontrada de maneira reduzida. A neurotransmissão ocorre pela liberação dos neurotransmissores pelo terminal axonal de um neurônio denominado de pré-sináptico e a captação por um neurônio denominado pós-sináptico. Imagem autoral.

As monoaminas biológicas que atuam como neurotransmissores compreendem 5-HT, NA e DA (DEAN; KESHAVAN, 2017). O SNC contém um vasto número de neurônios monoaminérgicos, os quais são responsáveis por modular diversas funções cerebrais. Os neurônios serotoninérgicos estão presentes em todas as áreas do cérebro e são considerados um dos maiores sistemas coesivos de neurotransmissores (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018). As alterações nos níveis de 5-HT estão associadas a mudanças nas funções somáticas e comportamentais, como humor, apetite, sono e memória (BRIGITTA, 2022), reafirmando seu papel no desenvolvimento da depressão, uma vez que essas alterações são classificadas como comportamentos depressivos (APA, 2022). Os neurônios noradrenérgicos se espalham do tronco cerebral para diversas regiões cerebrais (ATZORI et al., 2016; MALETIC et al., 2017). Diminuição da libido, apetite, concentração e comportamento agressivo são sintomas relacionados à uma redução nos níveis de NA no SNC, o que

também reafirma seu papel na patogênese da depressão (TREADWAY, 2016). Enquanto isto, os neurônios dopaminérgicos são localizados principalmente no mesencéfalo (GRACE, 2016) e são responsáveis pela modulação do sistema de recompensa e motivação. Assim como para as demais monoaminas, os níveis anormais de dopamina resultam em comportamentos relacionados à depressão, como falta de motivação, concentração e comportamento agressivo (SEO; PATRICK; KENNEALY, 2008).

Apesar de apresentarem localizações e funções distintas, a atuação das monoaminas está inter-relacionada e seus níveis cerebrais são dependentes (EL MANSARI et al., 2010). Estudos demonstram que a DA apresenta efeito inibitório na liberação de NA no locus ceruleus (GUIARD; EL MANSARI; BLIER, 2008), enquanto NA apresenta efeito excitatório e inibitório na liberação de DA na área tegmental ventral (GUIARD et al., 2008; LINNÉR et al., 2001). Os níveis de 5-HT no núcleo dorsal da rafe são aumentados por receptores de NA e DA. Estes dados indicam que a neurotransmissão monoaminérgica é interconectada e que uma alteração nos níveis de uma monoamina, provavelmente altera os níveis das demais (EL MANSARI et al., 2010).

Embora o sistema de monoaminas compreenda mais de um neurotransmissor, esta pesquisa teve enfoque no envolvimento do sistema serotoninérgico na ação do tipo antidepressivo da molécula avaliada. Sendo assim, a partir de agora direcionaremos nosso foco a este sistema.

3.3 Sistema Serotoninérgico

A 5-HT é uma monoamina amplamente distribuída no organismo sendo encontrada em diversos órgãos, tendo maiores concentrações na parede do intestino, no sangue e no SNC, onde apresenta funções variadas. Quando encontrada no sistema periférico, a 5-HT é sintetizada pelas células enterocromafins intestinais, células que revestem o lúmen do trato digestivo e respiratório, armazenadas no trato gastrointestinal e atuam como hormônio. Contração do intestino, útero e pâncreas, efeito cardiovascular e vasoconstritor são exemplos de efeitos observados na serotonina periférica (COWEN; BROWNING, 2015). No sangue, é encontrada em altas concentrações nas

plaquetas por estas apresentarem um mecanismo de captação de 5-HT de alta afinidade, sendo armazenadas a partir do plasma por transporte ativo para que possa ser liberada durante a agregação plaquetária em tecidos lesionados (RANG et al., 2015).

Pesquisas recentes têm avaliado a relação bidirecional entre o intestino e o cérebro, denominada eixo cérebro-intestino, relacionando doenças gastrointestinais com condições psiquiátricas através de moduladores específicos compartilhados, como serotonina e seu transportador, os quais vêm apresentando papéis importantes no desenvolvimento e função de ambos os órgãos (GENG et al., 2022; MARGOLIS, 2017). Entretanto, apesar de a 5-HT encontrada em algumas regiões da periferia estimular o SNC por diferentes mecanismos, esta não exerce função de neurotransmissão diretamente neste sistema, uma vez que não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (DAVID; GARDIER, 2016; MARGOLIS; CRYAN; MAYER, 2021). Sendo assim, para que a serotonina possa exercer seus efeitos como neurotransmissor, é necessário que ocorra a síntese desta monoamina diretamente no SNC. A síntese de 5-HT ocorre no tronco encefálico, nos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe (dorsal e mediana) (HUANG et al., 2019), cujas projeções axonais se distribuem e inervam diversas estruturas no sistema nervoso, como medula espinal, hipocampo e córtex (Figura 3) (HAASE; BROWN, 2015), e ocorre a partir do aminoácido essencial triptofano (obtido através da dieta), o qual apresenta capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (PARDRIDGE, 1979). As projeções dos núcleos da rafe para demais regiões cerebrais justificam as alterações cognitivas observadas com a desestabilização dos níveis serotoninérgicos cerebrais (CARHART-HARRIS; NUTT, 2017).

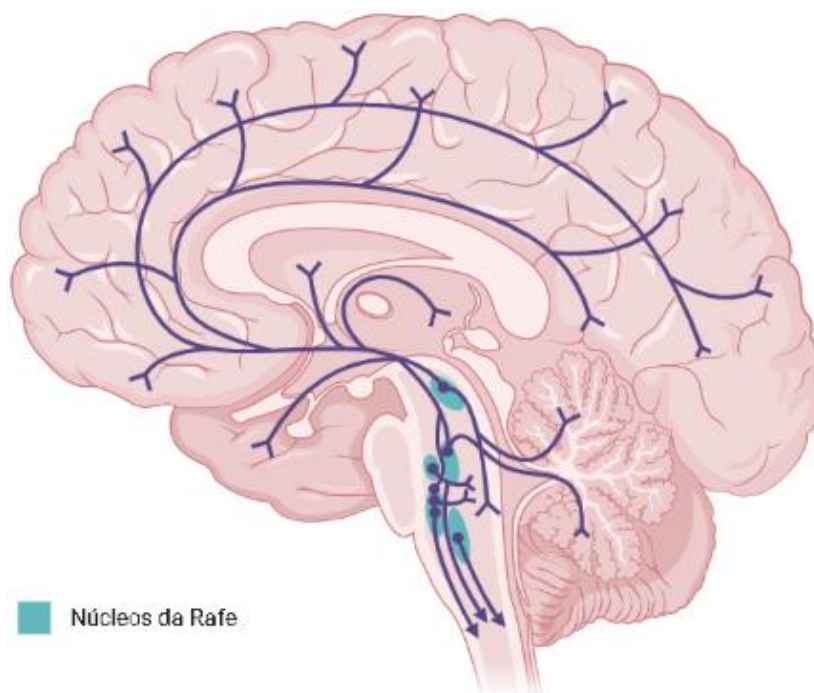


Figura 3. Representação do local de síntese e distribuição de serotonina. A 5-HT é sintetizada no tronco encefálico, nos núcleos da rafe, e distribuída para diversas regiões do cérebro. A via de distribuição está sinalizada em roxo. Fonte: obtida e adaptada do site www.biorender.com.

O transporte de L-triptofano do sangue para o SNC ocorre através de um transportador comum de aminoácidos presente na barreira hematoencefálica (PARDRIDGE, 1979). Uma vez no SNC, a biossíntese de 5-HT inicia pela conversão de L-triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) sob ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH – do inglês, *tryptophane hydroxylase*), a qual é catalisadora da reação de conversão, hidroxilando o L-triptofano. A enzima TPH apresenta duas isoformas no organismo: TPH-1 e TPH-2. Enquanto a isoforma TPH-1 é responsável pela conversão de L-triptofano em serotonina no sistema periférico, a TPH-2 converte este aminoácido em 5-HT no SNC (WALTHER et al., 2003; NORDQUIST; ORELAND, 2010). Após a formação do subproduto 5-HTP, este é rapidamente descarboxilado pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC – do inglês, *L-aromatic acid decarboxylase*), formando, por fim, a 5-HT (POURHAMZEH et al., 2022).

Após a síntese completa, a 5-HT é absorvida e armazenada em vesículas no terminal axonal do neurônio pré-sináptico por um transportador vesicular de monoamina tipo 2 (VMAT2 – do inglês, *vesicular monoamine transportes isoform*

2). Ao surgir um potencial de ação, a membrana do neurônio é despolarizada, fazendo com que a vesícula de armazenamento de 5-HT seja acoplada à membrana, liberando o neurotransmissor na fenda sináptica para a execução de suas ações no SNC (Figura 4) (DAVID; GARDIER, 2016; POURHAMZEH et al., 2022).

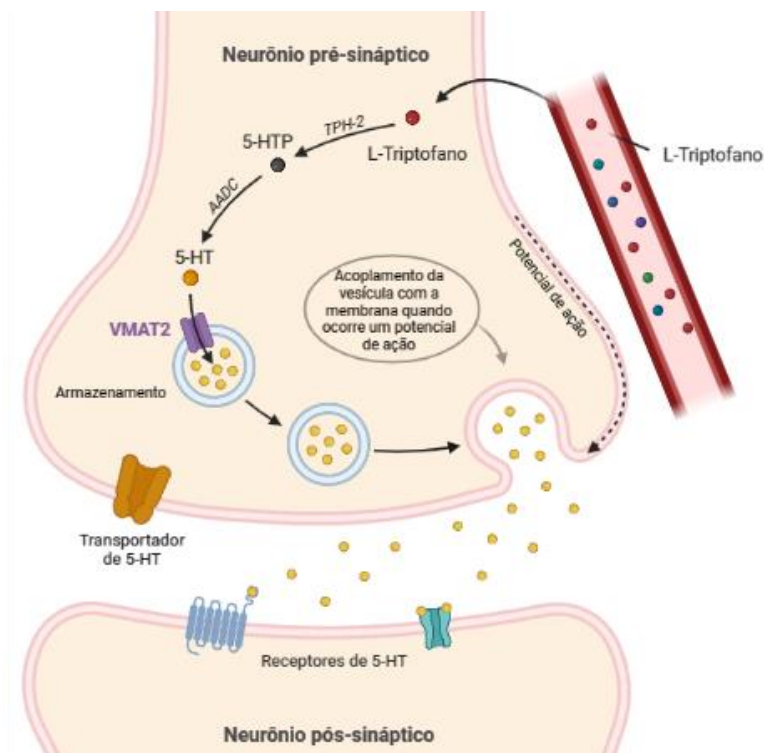


Figura 4. Biossíntese, armazenamento e liberação de 5-HT no SNC. Imagem autoral.

Uma vez liberada na fenda sináptica, a 5-HT pode desempenhar diferentes funções biológicas, dependentes das diferentes interações possíveis desta monoamina. Como exemplo de interações disponíveis e conhecidas, existem receptores pré-sinápticos (também conhecidos como autoreceptores) e pós-sinápticos específicos de 5-HT, transportadores de 5-HT e enzimas de metabolização de monoaminas (MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008).

Uma das justificativas para a complexidade funcional da 5-HT é a enorme quantidade de receptores disponíveis para interação no sistema nervoso. Embora a maior parte dos receptores de 5-HT estejam distribuídos no intestino

(RANG et al., 2015), direcionaremos o foco deste estudo para o SNC, uma vez que este é o tema de pesquisa.

Atualmente já foram identificados 15 subtipos de receptores serotoninérgicos, com suas variantes, subdivididos em 7 famílias (5-HT₁₋₇). Com exceção dos receptores da família 5-HT₃ que são classificados como ionotrópicos, as demais famílias de receptores serotoninérgicos são classificadas como metabotrópicos (RANG et al., 2015; MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008).

De maneira geral, receptores ionotrópicos são canais iônicos formados por 4 ou 5 subunidades e estão envolvidos principalmente em transmissões sinápticas rápidas. Esta classe de receptores, quando ativados pela formação de uma ligação, aumentam a permeabilidade do receptor para alguns íons permitindo sua entrada ou saída no neurônio. Já os receptores metabotrópicos apresentam 7 α -hélices que atravessam a membrana e interagem com uma proteína G no meio intracelular, a qual apresenta 3 subunidades distintas: α , β e γ . Estes receptores, quando ativados por uma interação, ativam a proteína G que inicia a uma cascata de reações de sinalização intracelular. As reações iniciadas são dependentes do tipo de proteína G acoplada ao receptor, podendo ser inibitória (*Gi*) ou excitatória (*Gs* e *Gq*) (DAVID; GARDIER, 2016; HENTER; DE SOUSA; ZARATE JR, 2018; HENTER; PARK; ZARATE JR, 2021; RANG et al., 2015). A forma *Gi* atua inibindo a via adenilato ciclase, diminuindo a produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Já a *Gs* apresenta o papel inverso, estimulando a via adenilato ciclase aumentando a formação de AMPc. Enquanto isso, a forma *Gq* não apresenta ação relacionada a via adenilato ciclase, atuando na ativação da fosfolipase C (PLC), aumentando a formação dos segundos mensageiros derivados de fosfolipídios inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (RANG et al., 2015). A Figura 5 demonstra o esquema geral dos receptores de células neurais.

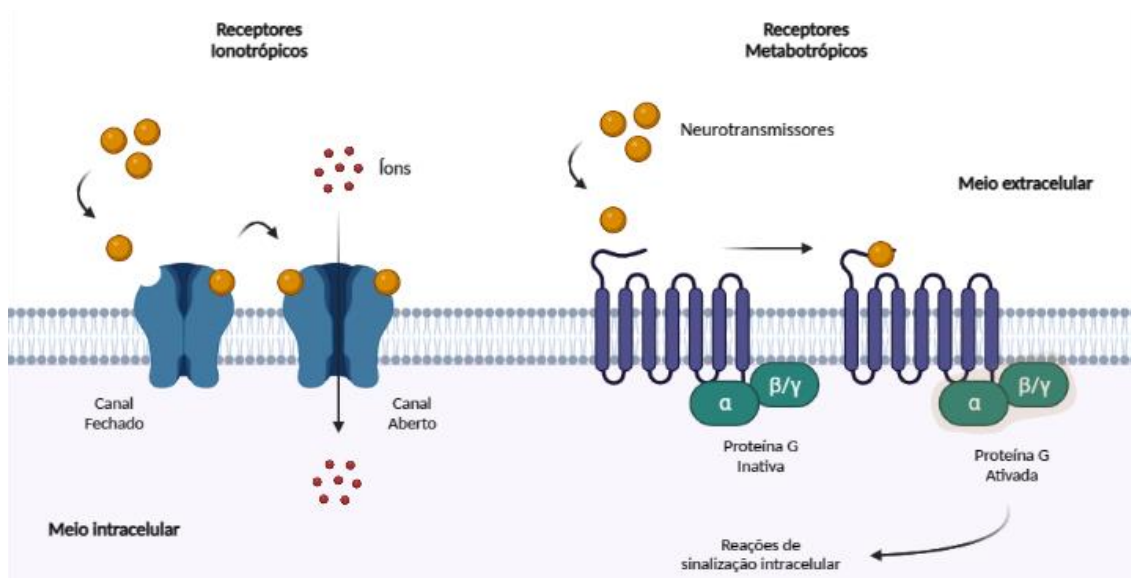


Figura 5. Esquema geral do funcionamento dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos de células neurais. Imagem autoral.

Os receptores de 5-HT expressos no SNC apresentam funções e regiões cerebrais variadas (RANG et al., 2015). Abaixo listamos algumas das principais características dos receptores serotoninérgicos das famílias 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5HT₇.

- ❖ 5-HT₁: os receptores presentes nesta classificação possuem efeitos predominantemente inibitórios. Através de mecanismos intracelulares, reduzem a produção de AMPc, inibindo a atividade neuronal. Estão amplamente distribuídos no sistema límbico, mas também se encontram nos núcleos da base e córtex. Ainda, são denominados autoreceptores uma vez que estão presentes no soma e no terminal axonal pré-sináptico dos neurônios serotoninérgicos e sua função inibitória modula a 5-HT disponível na fenda sináptica limitando a velocidade de disparo deste neurotransmissor, atuando em conjunto com o transportador de 5-HT. Esta família de receptores é subdividida em 5-HT_{1A-F} que são relacionados a comportamentos de sono, alimentação, termorregulação e locomoção, principalmente (DAVID; GARDIER, 2016; MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008; POURHAMZEH et al., 2022; PYTLIAK et al., 2011; RANG et al., 2015; TIGER et al., 2018).

- ❖ 5-HT₂: estes podem apresentar efeitos tanto inibitórios, quanto excitatórios, aumentando a liberação de neurotransmissores com estas características (GABA e glutamato, respectivamente). Por serem metabotrópicos acoplados a uma proteína *Gq*, aumentam a produção de segundos mensageiros derivados de fosfolípidios, resultando em uma estimulação neuronal. São encontrados em grandes proporções no córtex e sistema límbico e são subdivididos em 5-HT_{2A-C} (DAVID; GARDIER, 2016; MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008; POURHAMZEH et al., 2022; PYTLIAK et al., 2011; RANG et al., 2015) .
- ❖ 5-HT₃: os receptores desta classe apresentam efeitos excitatórios. Esta é a única família de receptores serotoninérgicos ionotrópicos e atuam estimulando a atividade de neurônios autônomos e nociceptivos favorecendo o influxo de cátions Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. Os receptores 5-HT₃ são encontrados na região do bulbo e em outras partes do tronco cerebral, mas também podem ser encontrados na medula espinal. Apresentam algumas subdivisões, porém a literatura apresenta maior extensão de pesquisas relacionadas às subunidades 5-HT_{3A} e 5-HT_{3B}, e estão relacionados a comportamento ansioso (DAVID; GARDIER, 2016; MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008; POURHAMZEH et al., 2022; RANG et al., 2015).
- ❖ 5-HT₄: essa família de receptores apresenta efeitos excitatórios e, por estarem acoplados a proteína G do tipo *Gs*, estimulam a via da adenilato ciclase, aumentando a produção de AMPc. São expressos em grandes quantidades no sistema límbico, gânglios basais, hipocampo e substância negra de neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos, e são encontrados nas subunidades 5-HT_{4A-H} (POURHAMZEH et al., 2022; PYTLIAK et al., 2011; RANG et al., 2015).
- ❖ 5-HT₅: por se tratar de receptores metabotrópicos acoplados a uma proteína G do tipo *Gi*, também apresentam atividade inibitória diminuindo a produção de AMPc. Pouco ainda se sabe sobre as atividades desta classe de receptores, mas há indícios de que, assim como os receptores da família 5-HT₁, uma classe de autoreceptores. Em humanos, é expresso na forma de 5-HT_{5A} e suas atividades estão relacionadas a locomoção e sono (POURHAMZEH et al., 2022; PYTLIAK et al., 2011; RANG et al., 2015) .

- ❖ 5-HT₆: também são receptores metabotrópicos acoplados e proteína Gs. Sendo assim, também apresentam efeito excitatório ativando a via de segundos mensageiros adenilato ciclase. São encontrados no hipocampo, córtex e sistema límbico em duas isoformas, e são relacionados a modulação de aprendizado e memória (POURHAMZEH et al., 2022; PYTLIAK et al., 2011; RANG et al., 2012).
- ❖ 5-HT₇: assim como os receptores da família 5-HT₄ e 5-HT₆, são metabotrópicos acoplados a proteína G do tipo Gs. Por esta razão, também estimulam a via adenilato ciclase, aumentando a produção de AMPc. Podem ser encontrados no hipocampo, córtex, amígdala, tálamo, hipotálamo e no soma e terminal axonal de neurônios GABAérgicos e, apesar de apresentarem as mesmas propriedades farmacológicas, são encontrados nas subunidades 5-HT_{7A-D}. Suas ações incluem termorregulação, modulação de humor e de sono (MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008; POURHAMZEH et al., 2022; PYTLIAK et al., 2011; RANG et al., 2015).

A Figura 6 ilustra a posição dos receptores serotoninérgicos descritos anteriormente.

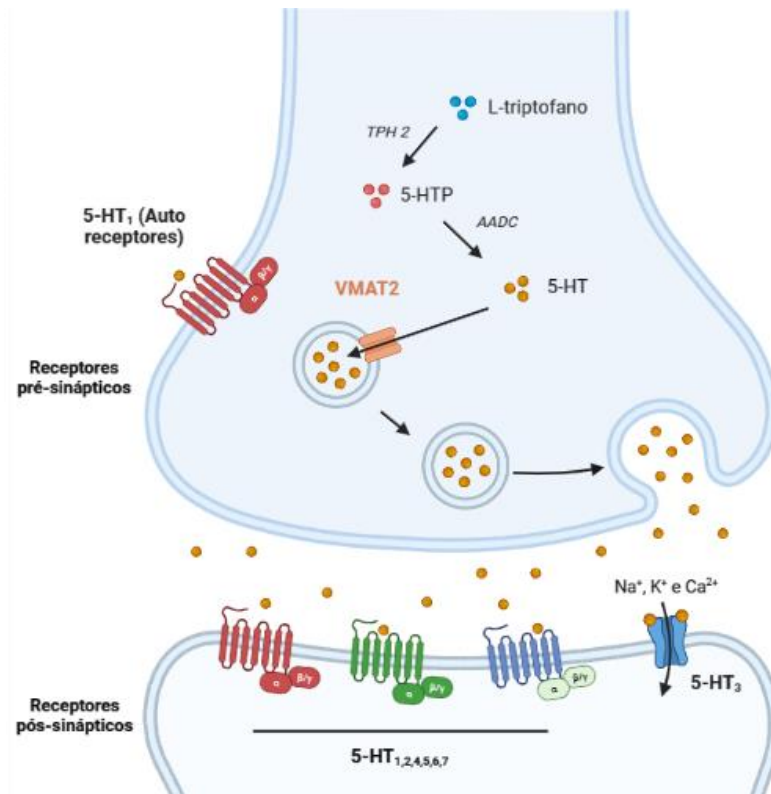


Figura 6. Ilustração da biossíntese, armazenamento, liberação e interação de 5-HT com seus receptores pré-sinápticos e pós-sinápticos. Imagem autoral.

Além da interação com seus receptores específicos, a 5-HT, ao ser liberada para a fenda sináptica, pode interagir com um transportador de serotonina (SERT – do inglês, *Serotonin Reuptake Transporters*). Os SERT's estão localizados nos terminais axonais e no soma de neurônios serotoninérgicos, mais especificamente no hipocampo, córtex, amígdala, cerebelo e hipotálamo, e agem removendo a 5-HT disponível no meio extracelular, controlando os níveis e a duração da disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica para interação com seus receptores (MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008; TIGER et al., 2018).

Como mencionado, os autoreceptores agem em conjunto com o SERT. A estimulação dos autoreceptores fornece um *feedback* negativo da liberação de 5-HT. Neste ponto, a liberação é diminuída e, em conjunto, SERT inicia a remoção de 5-HT excedente na fenda sináptica, transportando-a novamente para o interior do neurônio pré-sináptico podendo ocorrer o rearmazenamento

do neurotransmissor na vesícula de armazenamento ou sua degradação sob ação da enzima MAO (POURHAMZEH et al., 2022).

O transporte de 5-HT do meio extracelular para o meio intracelular é dependente de íons Na^+ e Cl^- . O mecanismo de transporte se assemelha ao de canais iônicos com outras funcionalidades, onde o SERT apresenta um sítio extracelular disponível para ligação de 5-HT. Para o transporte, é necessária a ligação de íons Na^+ e Cl^- em conjunto com a 5-HT para que ocorra uma alteração conformacional que fecha a abertura extracelular, abrindo uma abertura intracelular liberando os ligantes para o meio citoplasmático intracelular. Após esta dissociação, um íon K^+ presente no meio intracelular se liga à essa nova abertura, alterando novamente a conformação do SERT, fechando a abertura intracelular e reabrindo-a no meio extracelular liberando o íon K^+ . Sendo assim, o SERT, além de transportar 5-HT, é responsável pela movimentação de diferentes íons (Figura 7) sendo dependente da manutenção do gradiente de concentração do íon da membrana plasmática pelas bombas de Na^+/K^+ ATPase (GRUNST et al., BORTOLUZZI, 2012; 2021; RUDNICK; SANDTNER, 2019).

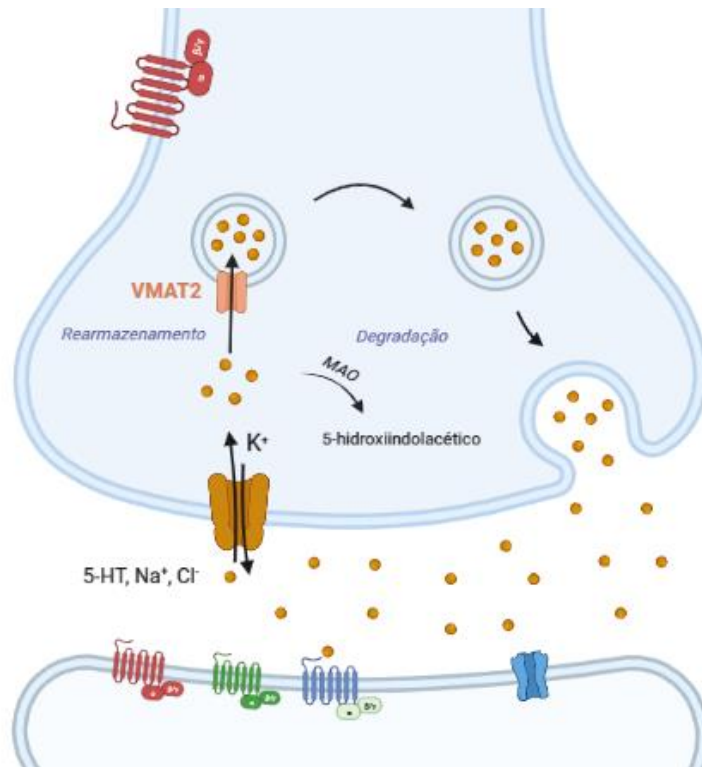


Figura 7. Ilustração do processo de transporte de 5-HT por SERT. Na figura são representados os processos de rearmazenamento pelo VMAT2, e degradação pela enzima MAO. Imagem autoral.

Além das interações mencionadas até o momento, a homeostasia do sistema serotoninérgico é regulada, também, pela MAO. A MAO é uma flavoenzima que está localizada na membrana externa das mitocôndrias dos neurônios, glias e outras células (COATRIEUX et al., 2007). Como também já mencionado, a 5-HT é degradada principalmente pela MAO (mais especificamente pela MAO-A, comentada mais adiante), por desaminação oxidativa (RANG et al., 2015). Em tecidos periféricos, como intestino, fígado, coração e outros órgãos, esta enzima participa protegendo o organismo, oxidando aminas provenientes do sangue ou prevenindo sua entrada na circulação sanguínea (MIALET-PEREZ; SANTIN; PARINI, 2018). Em tecidos neuronais, a MAO participa da regulação dos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos e regula os estoques intracelulares de monoaminas (COATRIEUX et al., 2007).

A reação catalisada pela MAO necessita de um dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) e envolve a conversão, por desaminação, das monoaminas em

aldeído e amônio com consequente formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os aldeídos produzidos são tóxicos e, por esta razão, são rapidamente convertidos em metabólitos menos prejudiciais sob ação de uma enzima aldeído desidrogenase (BORTOLATO; SHIH, 2011). Esta conversão resulta na formação de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), o qual é excretado na urina e utilizado como indicador da produção de 5-HT no organismo (RANG et al., 2015). A formação de H_2O_2 quando em excesso pode ser convertida em radicais hidroxilas ($\text{OH}\cdot$) que são altamente reativos, o que pode provocar danos celulares graves e apoptose celular contribuindo para o desenvolvimento de um quadro depressivo, uma vez que há evidências do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da depressão (COATRIEUX et al., 2007; BHATT; NAGAPPA; PATIL, 2020). A Figura 8 demonstra, de maneira geral, a reação de degradação de 5-HT sob ação da MAO.

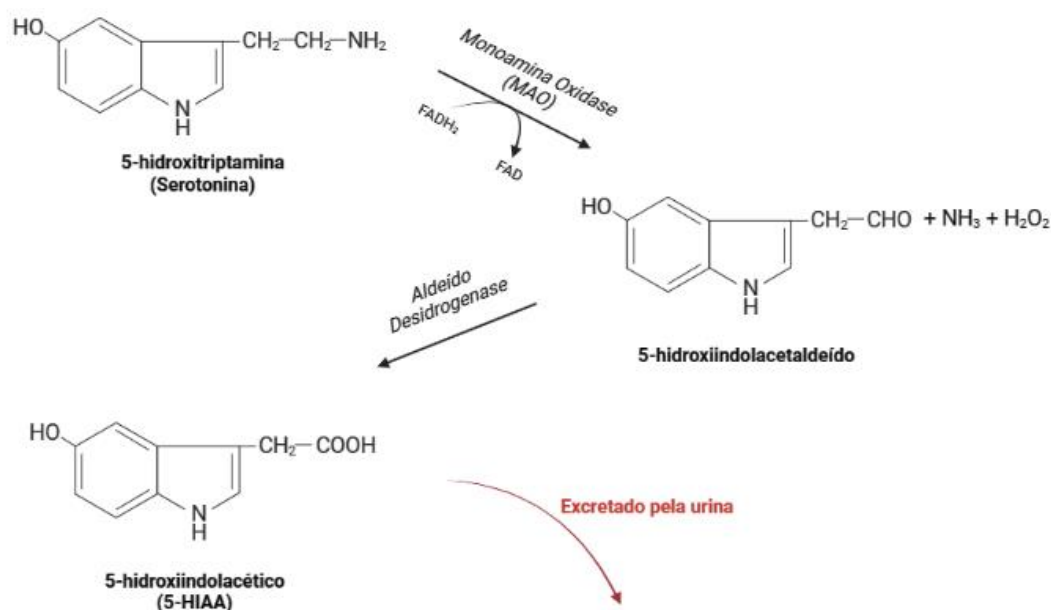


Figura 8. Representação da reação de degradação de 5-HT sob ação da enzima MAO. Fonte: adaptado de RANG (2012) e BORTOLATO (2011).

Duas são as isoformas da MAO, denominadas MAO-A e MAO-B. Estas se diferem quanto a preferência de substrato, distribuição anatômica, seletividade de inibidores e papel na regulação comportamental. A 5-HT é catabolizada preferencialmente pela MAO-A, apresentando uma afinidade 120

vezes maior quando comparada a isoforma B (BORTOLATO; SHIH, 2011). Um fato interessante é que em roedores é observado uma maior expressão da isoforma MAO-A do que da MAO-B, enquanto em cérebro humanos a isoforma B é mais presente. Isto se torna interessante ao ponto de que em neurônios serotoninérgicos a expressão de MAO-B é bem maior do que de MAO-A. Este dado sugere que a presença da MAO-B nestes neurônios é aumentada em função da 5-HT não ser um substrato preferido desta isoforma, fazendo com que o acúmulo de outros substratos seja dificultada para que não haja interferência no armazenamento e liberação de 5-HT nestes neurônio (SIEGEL et al., 1999).

A neurotransmissão serotoninérgica é bastante complexa e, por estar amplamente distribuída no SNC, está relacionada a modulação de diversas funções e comportamentos (ŚLIFIRSKI; KRÓL; TURŁO, 2021). De maneira geral, a sinapse de 5-HT é demonstrada na Figura 9 desde sua síntese, até sua liberação e degradação. Além das interações e alterações citadas ao longo desta dissertação, a 5-HT apresenta uma ampla modulação de sinalizações intracelulares que esculpem uma circuitaria bem mais complexa. Fatores neurotróficos relacionados a plasticidade neural também são modulados pela neurotransmissão serotoninérgica através das suas interações intercelulares (BORTOLUZZI, 2012), mas, por não serem o foco principal desta pesquisa não serão abordadas.

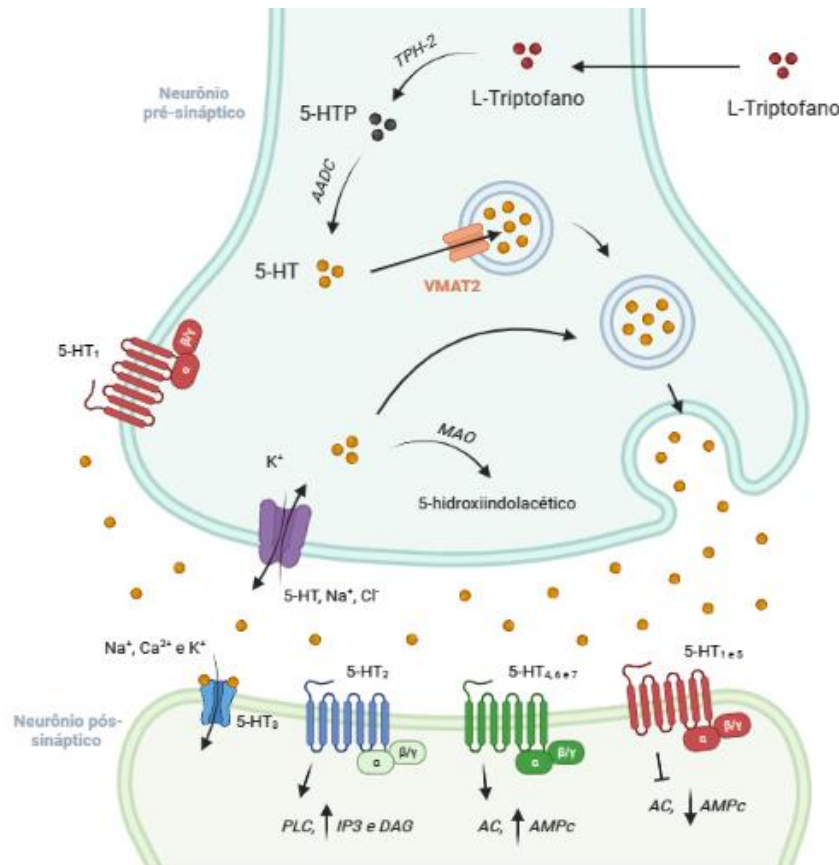


Figura 9. Ilustração geral da neurotransmissão serotoninérgica. Biossíntese, armazenamento, liberação, interação com receptores, transporte, rearmazenamento e degradação. Imagem autoral.

Apesar de atualmente existirem diversas evidências de alterações neurobiológicas envolvidas na fisiopatologia da depressão, a teoria monoaminérgica foi, durante décadas, responsável por descrever as alterações ocorridas no SNC que estavam relacionadas ao desenvolvimento do fenótipo depressivo (DA CRUZ et al., 2020; MALHI; MANN, 2018). Por esta razão, esta teoria também foi a base para o desenvolvimento dos principais fármacos antidepressivos disponíveis atualmente. Devido à complexidade do sistema de monoaminas, em especial a serotonina, os fármacos antidepressivos disponíveis atuam na regulação do sistema monoaminérgico por diferentes vias, como por exemplo na modulação de receptores, transportadores ou inibidores da enzima de degradação (PHILIP BOYCE, 2022).

3.4 Antidepressivos

Como já mencionado, a descoberta de fármacos antidepressivos foi feita por acaso a partir de efeitos colaterais gerados por medicamentos voltados ao tratamento de outras doenças, próximos a década de 50 (PEREZ-CABALLERO et al., 2019). Pesquisas realizadas ao longo dos anos acerca dos antidepressivos possibilitaram um grande progresso no tratamento da depressão (DRAPIER et al., 2007). Atualmente, os antidepressivos são, juntamente com a psicoterapia, as principais formas de tratamento para a depressão. Os fármacos antidepressivos são utilizados para reverter as desordens causadas pela depressão no SNC, regulando os processos neurobiológicos alterados (DA CRUZ et al., 2020).

Existem diversas classes de antidepressivos que se diferem por suas estruturas químicas e mecanismos de ação. A base farmacológica principal dos antidepressivos é o aumento da disponibilidade de neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica e este processo é regulado por diferentes processos neurobiológicos (DAVID; GARDIER, 2016). Dentre as classes de antidepressivos disponíveis temos os inibidores da MAO (IMAO's), antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS's), inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRN's), inibidores da recaptação de dopamina e noradrenalina (IRDN's), inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN's), entre outras (DA CRUZ et al., 2020; GRUNDMANN; KACIROVA; URINOVSKA, 2015).

Os IMAO's foram a primeira classe de antidepressivos descobertos e atuam na inibição da MAO, impedindo a degradação de 5-HT, NA e DA no meio intracelular (Figura 10). A inibição desta enzima pode ocorrer de forma seletiva e reversível ou de forma não-seletiva e irreversível para as isoformas da MAO, e possibilita que as monoaminas possam ser liberadas novamente na fenda sináptica, aumentando a disponibilidade destes neurotransmissores para interação. O aumento da disponibilidade de monoaminas no SNC é o fator responsável pelo efeito antidepressivo desta classe de antidepressivo (DA CRUZ et al., 2020; HILLHOUSE; PORTER, 2015; RANG et al., 2015).

Os ADT's surgiram a partir da imipramina, um fármaco sintetizado para teste de tratamento de pacientes com transtornos psiquiátricos. Apesar de não demonstrar melhora nos transtornos avaliados, foi observado uma redução de sintomas em pacientes deprimidos. Os ADT's não apresentavam um mecanismo de ação elucidado quando aprovados, então essa classe de antidepressivo foi nomeada através da sua estrutura química, os quais apresentavam 3 anéis de benzeno. Atualmente sabe-se que os ADT's apresentam um mecanismo bem diversificado, estando envolvidos na inibição da recaptação de noradrenalina e serotonina, e bloqueio de receptores noradrenérgicos, muscarínicos e histamínicos (Figura 10). Assim como nos IMAO's, o efeito antidepressivo desta classe está relacionada ao aumento na disponibilidade de monoaminas no SNC através do bloqueio da recaptação de noradrenalina e serotonina (DA CRUZ et al., 2020; HILLHOUSE; PORTER, 2015; LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009).

Apesar de extremamente importantes para o conhecimento da neurobiologia e tratamento de quadros depressivos, estas classes ainda apresentavam uma série de efeitos adversos, trazendo sintomas indesejados aos pacientes em tratamento. Pesquisas realizadas ao longo dos anos acerca destas classes de fármaco abriram caminho para o desenvolvimento de antidepressivos com mecanismos de ação mais específicos (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009), como os IRSN's que se assemelham aos ADT's inibindo as proteínas transportadoras de 5-HT e NA, mas sem ação farmacológica em receptores pós-sinápticos (HILLHOUSE; PORTER, 2015); os ISRS's que atuam na inibição apenas do transportador de 5-HT e, atualmente, são utilizados como fármacos antidepressivos de primeira linha (TACIAK; LYSENKO; MAZUREK, 2018); ISRN's que atuam inibindo a recaptação de NA pela inibição do seu transportador; e os IRDN's que atuam no bloqueio do transportador de DA e NA (BAGHAI; VOLZ; MÖLLER, 2006). O mecanismo de ação destas classes de antidepressivos está esquematizado na Figura 10. A ação antidepressiva destas classes de antidepressivos também é dada em razão do aumento da biodisponibilidade de monoaminas, principalmente 5-HT e NA, na fenda sináptica para interação com seus receptores (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

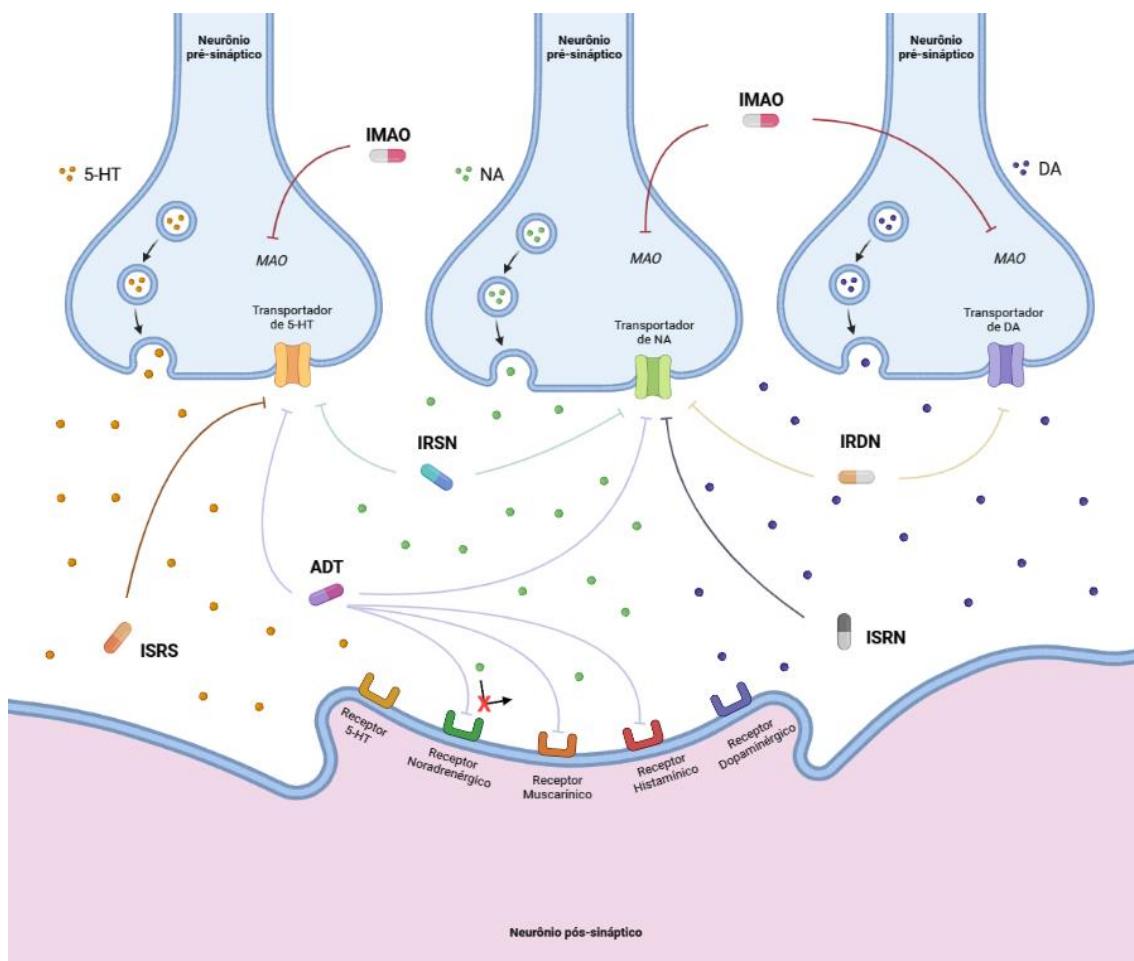


Figura 10. Ilustração do mecanismo de ação das principais classes de antidepressivos. ADT: antidepressivo tricíclico; IMAO: inibidor da monoamina oxidase; IRDN: inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina; IRSN: inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina; ISRN: inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina; ISRS: inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Imagem autoral.

Atualmente novas classes de antidepressivos monoaminérgicos vem sendo pesquisadas. A modulação do sistema de monoaminas também é realizada pela interação destes neurotransmissores com seus receptores específicos, estando estes envolvidos na regulação de funções mentais, cognitivas e motoras (ŚLIFIRSKI; KRÓL; TURŁO, 2021). O entendimento das diferentes localizações e vias neurobiológicas moduladas pelos receptores faz com que estes se tornem marcadores extremamente interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos, podendo apresentar menores efeitos adversos quando comparado aos fármacos disponíveis atualmente. Outro dado que torna a modulação da ação destes receptores excelentes candidato a novos

fármacos é que muitos destes receptores estão associados a fisiopatologia de transtornos psiquiátricos (SLIFIRSKI; KRÓL; TURLO, 2021; PILOWSKY, 2018).

Como mencionado, além das alterações observadas no sistema monoaminérgico em um quadro depressivo, evidências têm demonstrado diversas outras vias envolvidas na fisiopatologia da depressão. Por esta razão, parte dos indivíduos acometidos pela depressão não apresentam resposta aos antidepressivos monoaminérgicos (MALHI; MANN, 2018).

Nas últimas décadas, diversos estudos investigam ação antidepressiva em moléculas com mecanismo de ação envolvendo modulação de outras vias, além do sistema monoaminérgico. A (*RS*)-2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclohexan-1-ona (cetamina) é um exemplo de fármaco testado para ação antidepressiva tendo seu mecanismo de ação na modulação do sistema glutamatérgico, mais especificamente, agindo como antagonista não competitivo dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), um receptor específico de glutamato. Em estudos pré-clínicos, a cetamina apresenta efeito anestésico em altas doses, mas, em doses baixas, apresenta efeito antidepressivo de ação rápida, diferindo dos fármacos monoaminérgicos. Porém, assim como os demais antidepressivos já disponíveis, este efeito vem acompanhado de efeitos adversos (CORRIGER; PICKERING, 2019; PELTONIEMI et al., 2016).

No ano de 2020 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o primeiro fármaco antidepressivo na forma de spray nasal, a escetamina. Esta é um enantiômero da cetamina e é utilizada em conjunto com antidepressivos orais para tratamento de depressão resistente (BAHR; LOPEZ; REY, 2019; PINHEIRO, 2020). Entretanto, apesar de apresentar seu mecanismo de ação como antagonista de um receptor do sistema glutamatérgico – o NMDA – este fármaco atua restaurando os baixos níveis de monoamina, fazendo com que a modulação do sistema monoaminérgico ainda seja a base central do tratamento para a depressão (MORGESE; TRABACE, 2019).

Apesar das diversas opções farmacológicas disponíveis atualmente se mostrarem efetivas em uma grande parcela da população, a presença de efeitos colaterais ainda apresenta uma problemática imensurável aos fármacos antidepressivos (LI, 2020). O desenvolvimento dos ISRS's diminui a prescrição

de antidepressivos com mecanismos menos seletivos, como os ADT's e os IMAO's, uma vez que a maior seletividade no mecanismo de ação traz menores efeitos colaterais. Ainda assim, sintomas como disfunção sexual, ganho de peso, náuseas e dores de cabeça são efeitos colaterais comumente observados em pacientes em tratamentos com ISRS (LI, 2020; MALHI; MANN, 2018).

Outro fator que contribui com a problemática atual é a alta latência de antidepressivos monoaminérgicos para a remissão dos sintomas ou a não-resposta por aproximadamente 30% da população de pessoas acometidas pela depressão. Alguns fatores podem contribuir com a não-resposta ao tratamento, podendo ser fatores genéticos, fatores ligados ao paciente, como desleixo, personalidade ou idade, ou a presença de comorbidades que reduzem a probabilidade de resposta do fármaco (MALHI; MANN, 2018).

Com base no enunciado, o desenvolvimento de novos antidepressivos, bem como novas estratégias para tratamento, se mostram de extrema importância (LI, 2020). Na última década, pesquisas relacionadas aos compostos heterocíclicos contendo o grupo 1,2,3-triazol com diferentes hibridizações têm demonstrado diversas atividades biológicas importantes, tornando esta classe de compostos um grupo de interesse para a química medicinal.

3.5 1,2,3-Triazol

Os triazóis são um grupo de compostos químicos N-heterocíclicos pertencentes à classe dos azóis, ou seja, compostos heterocíclicos contendo nitrogênio (N) na sua estrutura, com fórmula molecular $C_2H_3N_3$ (Figura 11). Os azóis tem sido considerados uma classe de compostos promissora por apresentar vantagens sobre as modificações estruturais e interações biológicas devido a presença dos átomos de N em seu anel (BOZOROV; ZHAO; AISA, 2019).

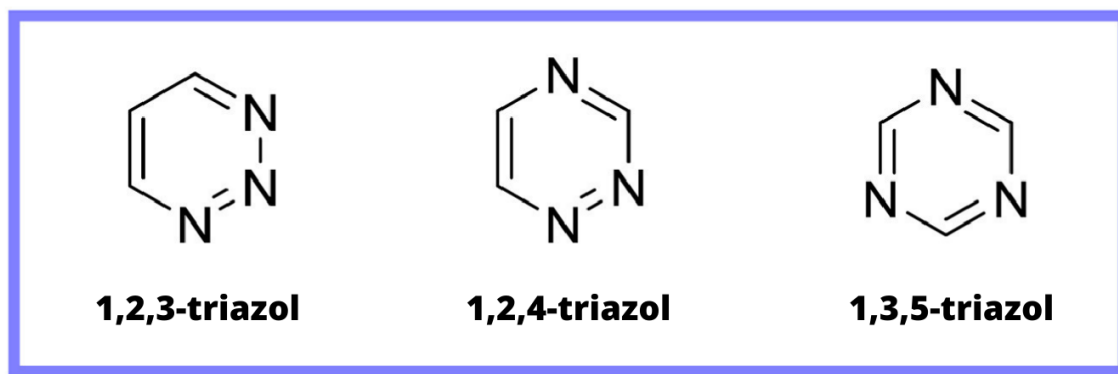


Figura 11. Fórmula estrutural dos triazóis. Fonte: Traduzido de Singh, 2021.

Em particular, a classe dos 1,2,3-triazóis tem sido considerada fascinante por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas e aplicações farmacêuticas. Esta variedade de atividades está relacionada a sua capacidade de formar diversas interações covalentes, como ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo, forças de *van der Waals* e interações hidrofóbicas com diferentes alvos biológicos (REZKI et al., 2020).

Na última década, os 1,2,3-triazóis ganharam um grande destaque na química heterocíclica moderna, sendo considerado um andaime na química orgânica, química de polímeros e química medicinal. Devido a sua diversidade de atividade nas ciências biológicas, têm sido frequentemente aplicados na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (AOUAD et al., 2018; FALLAH et al., 2022; REZKI et al., 2016). Dentre suas propriedades biológicas versáteis, pode-se destacar atividade antimicrobiana, antifúngica, antituberculose, antiinflamatória, anticancerígena, analgésica, anticonvulsivante, antiviral, antimalárica, anti-HIV, alteração no SNC, entre outras (AL-BLEWI et al., 2018; DESWAL et al., 2022; IHMAID et al., 2021).

Outra atividade interessante dos 1,2,3-triazóis é sua atuação como surfactante não iônico, ou seja, sua capacidade anfifílica, a qual permite interação em meios tanto polares, quanto apolares, tornando esta classe de compostos ainda mais utilizada (REZKI et al., 2016). Sua atuação como surfactante facilita a uma conexão entre dois farmacóforos, que são moléculas capazes de formar interações a nível supramolar com alvos biológicos específicos, desencadeando ou bloqueando sua resposta biológica. Estas

características fazem dos 1,2,3-triazóis moléculas importantíssimas na química medicinal para o planejamento e desenvolvimento de drogas sintéticas bifuncionais a partir da formação de moléculas híbridas (AL-BLEWI et al., 2018; REZKI et al., 2016). A partir desta capacidade, vários compostos híbridos com diferentes atividades biológicas foram sintetizados para tratar mais de uma doença e estão em fase de teste clínico (IHMAID et al., 2021).

Ademais, há evidências de que moléculas contendo esta classe de composto apresentam atividade antidepressiva semelhante aos IMAO's e ISRS's, o que garante aos derivados de 1,2,3-triazol mais uma atividade biológica não muito mencionada na literatura (SINGH et al., 2021). Alguns estudos (DONATO et al., 2013; FRONZA et al., 2022a; 2022b) realmente demonstram a atividade do tipo antidepressiva de compostos contendo triazol em análises pré-clínicas. Porém, as pesquisas acerca da ação antidepressiva ainda são bastante limitadas.

3.6 Acetofenona

Acetofenonas (Figura 12) são as cetonas aromáticas de estrutura mais simples que fazem parte da classe dos compostos fenólicos. Seus derivados atuam como intermediários sintéticos para a produção de uma diversidade de produtos, como corantes, produtos agroquímicos e farmacêuticos (KORE; SRIVASTAVA; SATPATI, 2015). São amplamente utilizadas na química orgânica para a síntese de compostos heterocíclicos auxiliando na formação de moléculas grandes com diferentes componentes (MOHAMMADI ZIARANI; KHEILKORDI; MOHAJER, 2020).

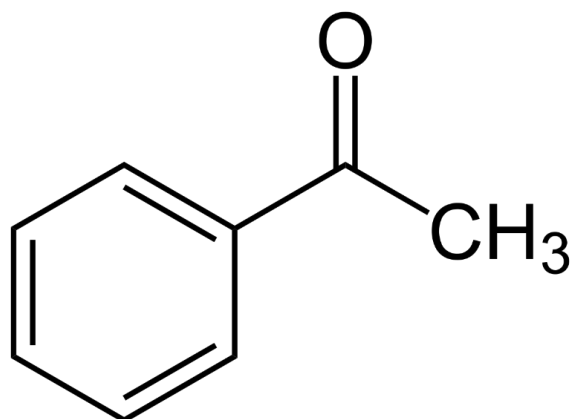


Figura 12. Fórmula estrutural da acetofenona. Disponível em: Acetofenona – Wikipédia, a enciclopédia livre (wikipedia.org), acessado em 20 de janeiro de 2023.

As acetofenonas são encontradas em inúmeros produtos naturais, presentes em alimentos e sendo o principal constituinte de diversas plantas, como metabólitos secundários necessários para a adequação e sobrevivência da espécie (ZUBKOV; KOUZNETSOV, 2023). Por se tratar de uma classe de compostos que envolve uma grande quantidade de moléculas com diferentes ligantes, apresentam diferentes atividades biológicas como analgésica, antioxidante, anticancerígena, antifúngica, antiinflamatória, antibacteriana, antiespasmódica, neuroprotetora, entre outras (WANG et al., 2020; ADKI; KULKARNI, 2020; MOHAMMADI ZIARANI; KHEILKORDI; MOHAJER, 2020; REBELLO, 2005) .

Esta classe de composto é amplamente utilizada na química medicinal por apresentar características estruturais importantes para processos de reconhecimento biológico. Pode ocorrer uma interação da molécula com o sítio de ligação por ligações de hidrogênio, onde o oxigênio da carbonila atuará comoceptor desta interação devido a presença de pares de elétron e da planaridade do grupo cetona. Ainda, a interação com o sítio de ligação pode ser realizada por ligações dipolo-dipolo com o grupo cetona devido ao seu momento dipolar (COSTA et al., 2021).

As acetofenonas também são utilizadas como “esqueletos” para o desenvolvimento de diversos fármacos para o tratamento de diferentes doenças, como por exemplo a Bupropiona, para o tratamento de depressão, que apresenta

uma porção desta classe de composto na sua estrutura (Figura 13) (ZUBKOV; KOUZNETSOV, 2023).

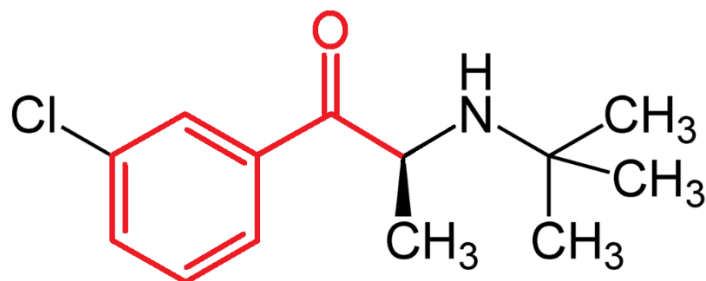


Figura 13. Fórmula estrutural da Bupropiona – fármaco antidepressivo – com a porção acetofenona em destaque. Adaptado de: Bupropiona – Wikipédia, a enciclopédia livre (wikipedia.org), acessado em 20 de janeiro de 2023.

Sendo assim, tendo em vista a diversidade de vantagens e características das acetofenonas, sua utilização para o desenvolvimento de novos fármacos é considerada promissora quando avaliado sua fácil obtenção, eficácia de medicamentos tradicionais que têm sua estrutura como base e sua gama de propriedades farmacológicas (ZUBKOV; KOUZNETSOV, 2023).

3.7 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona (ETAP)

Tendo em vista as propriedades mencionadas acerca dos 1,2,3-triazóis e das acetofenonas, e a falta de material na literatura relacionados a atividade antidepressiva destas classes de compostos, consideramos interessante a avaliação deste efeito em uma molécula híbrida combinando estes grupos químicos para o desenvolvimento de um possível candidato a novo fármaco.

Pesquisas envolvendo desenvolvimento de novas opções de farmacoterapia envolvem a necessidade de uma equipe ampla e multidisciplinar para que seja realizado o acompanhamento desde sua síntese, até as análises *in sílico*, *in vitro* e *in vivo*, para que posteriormente possam ser realizadas as análises clínicas com maior segurança (KREUTZER et al., 2022). Nesse sentido, foram sintetizadas 17 novas moléculas de 1,2,3-triazol-acetofenonas pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) locado na Universidade Federal

de Pelotas (UFPel) e avaliada sua atividade *in silico* e *in vitro* na interação com ambas isoformas da MAO. Os resultados *in silico* encontrados e publicados por Costa (2021) demonstraram que a ETAP apresentou valores de -9.7 e -8.5 para interação com as isoformas MAO-A e MAO-B, respectivamente. Posteriormente, a ETAP demonstrou uma inibição *in vitro* significativa da MAO em ambas as isoformas, MAO-A e MAO-B, dependente da concentração avaliada. Ainda, os valores de IC₅₀ apresentados pela ETAP demonstraram valores menores para isoforma MAO-A, apresentando valores mais próximos ao encontrado pela clorgilina (composto utilizado como controle por apresentar atividade inibitória da MAO-A já conhecida) quando comparadas as demais moléculas avaliadas (COSTA et al., 2021). Sendo a MAO-A a isoforma enzimática com maior afinidade de degradação para 5-HT e sabendo o papel fundamental deste neurotransmissor na regulação de humor, uma maior disponibilidade desta monoamina é essencial para a ação antidepressiva, conforme mencionado anteriormente (BORTOLATO; SHIH, 2011; DA CRUZ et al., 2020; HILLHOUSE; PORTER, 2015).

Sendo assim, os resultados encontrados aumentaram nosso interesse na atividade antidepressiva destas moléculas, levando-nos a crer que a molécula 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona (ETAP – do inglês, 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazoyl)phenyl)ethan-1-one)(Figura 14) seja um interessante candidato a futuro novo fármaco antidepressivo (COSTA et al., 2021).

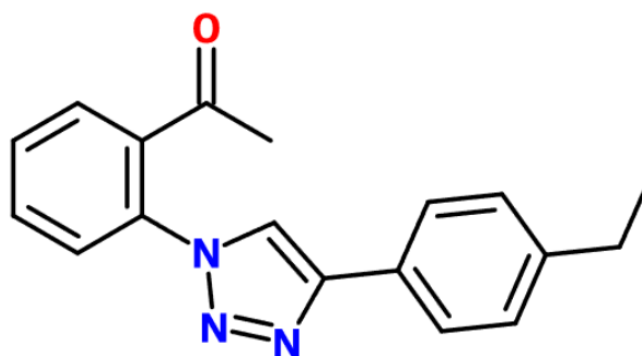


Figura 14. Estrutura química da 1-(2-(4-(4-etilfenil)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-il)fenil)etan-1-ona (ETAP). Imagem autoral.

Entretanto, para que um novo fármaco possa ser enviado para sua fase de testes clínicos, ou seja, para que possa ser testado em humanos, uma série de características acerca desta molécula devem ser apresentadas às autoridades reguladoras, como testes *in vitro* e *in vivo* sobre mecanismos de ação e toxicidade no organismo (BOURIN, 2016). Por se tratar de testes em meio artificial, as análises *in vitro* acabam não apresentando um caráter confiável de segurança para a molécula, sendo estas informações demonstradas com maior confiabilidade por análises *in vivo* (LANGHANS, 2018). Análises *in vivo* requerem a utilização de modelos animais, especialmente os roedores, que são, tradicionalmente, a forma mais antiga e valiosa de fornecer as informações necessárias, permitindo o reconhecimento e desenvolvimento de novos fármacos (KOLAR et al., ALEKSANDROVA; WANG; PHILLIPS, 2019; 2021).

3.8 Uso de modelos animais e testes comportamentais para depressão

O uso de modelos animais em pesquisas anatômicas e fisiológicas contribui com informações valiosas para o conhecimento e avanço da medicina moderna e da farmacologia para o tratamento de diversas doenças, sendo utilizado há séculos. Dentre as principais vantagens do uso de animais na pesquisa estão a possibilidade de realizar procedimentos invasivos, testes de hipóteses direcionadas e identificação de mecanismos de ação de fármacos em etapa de teste (ALEKSANDROVA; WANG; PHILLIPS, 2019; KOLAR et al., 2021; ROBINSON et al., 2019).

Entretanto, um modelo animal deve cumprir algumas exigências para que possa ser utilizado. Alguns autores sugerem que uma revisão clássica propõe 3 critérios para sua validade: validade preditiva, validade de face e validade de construto. A validade preditiva se relaciona a resposta do organismo ao tratamento, ou seja, se um determinado medicamento é eficiente em humanos em determinadas condições, deve agir igualmente nos animais expostos a mesma condição. A validade de face se refere a sintomatologia, portanto, a condição clínica observada em humanos deve ser análoga e reprodutível no animal, tanto comportamental quanto biológica. Já a validade de construto se

refere a fundamentação teórica, ou seja, humanos e animais devem compartilhar dos mesmos fatores causadores e desencadeadores da doença, e o modelo deve poder ser reproduzido por outros pesquisadores (BELZUNG; WILLNER; PHILIPPOT, 2015; HARRO, 2019).

Em relação a depressão, ao longo dos anos o uso de animais em pesquisas foi refinado para se assemelhar cada vez mais ao comportamento humano permitindo um progresso no que diz respeito ao conhecimento e entendimento das alterações observadas tanto a nível comportamental, quanto a nível neurobiológico (HARRO, 2019; WANG et al., 2017). Alterações em regiões específicas do cérebro geram um determinado comportamento moldado por esta região, conforme mencionado no item **3.3** e, a partir disto, podemos relacionar alterações cognitivas e comportamentais observadas em um quadro depressivo humano, com parâmetros observados nos modelos animais e testes comportamentais. Entretanto, alguns sintomas como culpa excessiva e ideação suicida são característicos da nossa espécie, não podendo ser mensurados em animais e, por esta razão, tendo a condição clínica parcialmente reproduzida (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019).

Foi a partir do uso de modelos animais que entendemos que a fisiopatologia da depressão não pode ser definida apenas por um mecanismo, mas sim pelo envolvimento de vários. Por esta razão, um único modelo não é suficiente para descrever a etiologia completa da depressão, sendo recomendado a combinação de diferentes modelos relacionados a diferentes evidências envolvidas na fisiopatologia deste transtorno para que se possa avaliar diferentes aspectos da depressão (SÖDERLUND; LINDSKOG, 2018; WANG et al., 2017).

O uso de animais no estudo da depressão ainda permite fazer uma diferenciação entre os termos “modelo” e “teste”. Embora frequentemente utilizado como sinônimos, um modelo animal para depressão gera uma modulação neurobiológica para induzir o transtorno, enquanto os testes comportamentais são utilizados para mensurar parâmetros relacionados a depressão de forma rápida e simples (HARRO, 2019).

Conforme já referenciado, diferentes fatores estão relacionados ao desenvolvimento da depressão. Sendo assim, se um modelo animal para o estudo deste transtorno é capaz de moldar uma alteração neurobiológica, é correto afirmar que são necessários diferentes modelos para avaliar estas etiologias ou um modelo que englobe todas. De fato, diversos modelos são encontrados na literatura para a avaliação de depressão, diferindo, justamente, nas alterações neurobiológicas induzidas pela metodologia aplicada (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019). Dentre os mais frequentemente utilizados destacam-se os de indução via estresse como separação materna, derrota social e estresse leve crônico imprevisível (UCMS – do inglês, *unpredictable chronic mild stress*), e os de alterações biológicas como injeção de lipopolissacarídeo (LPS) e corticosterona (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019; WANG et al., 2017).

Já os testes, são utilizados com o objetivo de quantificar parâmetros comportamentais a fim de avaliar o comportamento do animal exposto a diferentes condições, e são comumente utilizados em triagem preditiva de fármacos em fase de teste pré-clínico (HARRO, 2019). Os parâmetros avaliados envolvem comportamentos de desespero e desesperança, anedonia, apatia, aversão social e ansiedade, que são característicos da depressão (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021; PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019).

Levando em consideração a necessidade do seguimento da validade preditiva, os fármacos devem apresentar efeitos semelhantes em humanos e roedores. Os testes comportamentais via desespero, como o TSC e TNF, são os mais comumente utilizados para tal finalidade (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021; HARRO, 2019). Tanto o TSC, quanto o TNF, tem como base a exposição dos animais a situações estressantes onde a fuga é impossibilitada. No TSC o animal é suspenso pela cauda em um aparato específico e avaliado por um tempo dependente da metodologia aplicada (Figura 15A). Enquanto no TNF o animal é colocado em um cilindro contendo água em uma altura suficiente para que o animal não toque no chão nem saia do aparato, e observado por tempo dependente da metodologia (Figura 15B). Em ambos os testes os animais tendem a apresentar comportamento ativo no início tentando escapar da situação, mas, ao longo do teste, são observados surtos de imobilidade que são

relacionados ao comportamento de desespero observado na depressão (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021; PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019). Na utilização destes testes, os parâmetros avaliados normalmente incluem latência para o primeiro episódio de imobilidade e tempo de imobilidade total após o tempo de observação (HAO et al., 2019; HARRO, 2019).

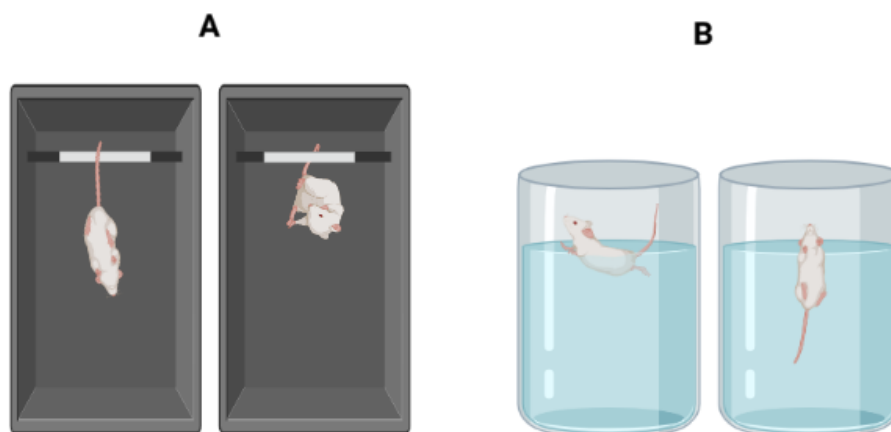


Figura 15. Representação dos testes comportamentais mais utilizados para triagem preditiva de novos fármacos. (A) demonstra os movimentos do animal no TSC, onde se apresenta imóvel e em tentativa de fuga, respectivamente. (B) demonstra o movimento do animal no TNF, onde se apresenta em tentativa de fuga e imóvel, respectivamente. TSC: Teste de Suspensão pela Cauda; TNF: Teste do Nado Forçado. Imagem autoral.

Além dos testes utilizados para avaliação do comportamento depressivo, a triagem de novos fármacos também envolve a avaliação de uma possível alteração na atividade locomotora dos animais após aplicação (FERREIRA et al., 2018). Para isto, é utilizado o TCA, que consiste na colocação do animal em uma caixa dividida em 9 quadrados iguais (Figura 16) e avaliado o seu comportamento por um tempo dependente da metodologia. Os parâmetros avaliados são relacionados a atividade locomotora, pelo número de cruzamentos entre os 9 quadrados, e exploratória, pela quantidade de vezes que o animal se apoia sobre as patas posteriores (STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018; WALSH; CUMMINS, 1976).

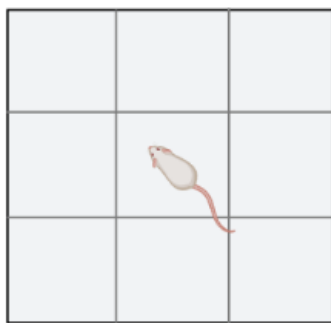


Figura 16. Representação do teste comportamental para avaliação das atividades locomotora e exploratória, TCA. TCA: Teste do Campo Aberto. Imagem autoral.

Tendo em vista todo conteúdo abordado, nossa pesquisa visou avaliar o efeito do tipo antidepressivo de uma classe inédita de compostos 1,2,3-triazol-acetofenonas nos testes comportamentais mais comumente utilizados para triagem pré-clínica de novos fármacos. Ainda, avaliamos a contribuição do sistema serotoninérgico nesta ação pelos receptores 5-HT₁, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ e 5-HT₄, e a necessidade da integridade deste sistema. Ademais, avaliamos o perfil toxicológico da molécula avaliada.

4. Manuscrito

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, submetido a um periódico científico internacional. O manuscrito em questão é dividido em: Resumo, introdução, resultados e discussão, conclusões, materiais e métodos e referências, conforme padrão da revista.

Antidepressant-like effect of 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one in mice: evidence of the contribution of the serotonergic system

Marcelo Heinemann Presa¹, Marcia Juciele da Rocha¹, Camila Simões Pires¹, Kauane Nayara Bahr Ledebuhr¹, Gabriel Pereira da Costa², Diego Alves², Cristiani Folharini Bortolatto^{1*}, César Augusto Brüning^{1*}.

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Neuropharmacology (LABIONEM), Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting (PPGBBio), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), P.O. Box, 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

²Laboratory of Clean Organic Synthesis (LASOL), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), P.O. Box, 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

*Correspondence should be sent to:

César Augusto Brüning - Laboratory of Biochemistry and Molecular Neuropharmacology (LABIONEM), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Phone: 55-53-32757355. Electronic address: cesar.bruning@ufpel.edu.br. ORCID: 0000-0003-0814-0203

Cristiani Folharini Bortolatto - Laboratory of Biochemistry and Molecular Neuropharmacology (LABIONEM), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Phone: 55-53-32757355. Electronic address: cbortolatto@gmail.com. ORCID: 0000-0002-9509-4446

Abstract

Major Depressive Disorder (MDD) is a psychiatric disorder characterized by mood disturbances and a persistent feeling of sadness. The monoamine system, especially the serotonergic system, is deeply involved in both the pathogenesis of depression and the mechanism of action found in the majority of known antidepressant drugs. Unfortunately, current pharmacological therapies do not meet the neurobiological needs of all depressed patients, with a large proportion of patients showing no response to antidepressants, requiring the development of new therapy options. In this context, compounds containing triazole heterocyclic groups have shown interesting biological activities, including antidepressant activity. In this study, the antidepressant activity of an unprecedented hybrid containing 1,2,3-triazole and acetophenone in this structure, 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one (ETAP), was evaluated in different doses (0.5 – 5 mg/kg, intragastrical (i.g.)) in the forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST) in male mice. To investigate the involvement of the serotonergic system in its antidepressant action, serotonergic depletion and specific serotonin receptors antagonists were used and evaluated in the TST. ETAP showed antidepressant-like effect in both FST and TST from the dose of 1 mg/kg, without altering locomotor and exploratory activities of the animals. In addition, it was demonstrated the need for the integrity of the serotonergic system and the involvement of 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₄ receptors in the antidepressant-like effect of ETAP. Moreover, the ETAP showed low toxicity potential. In this way, ETAP could be an interesting molecule for the development of therapeutic strategies for MDD.

Key words: Major depressive disorder; Antidepressant; Triazole; Acetophenone; Serotonin; Mice.

1. Introduction

Major Depressive Disorder (MDD) is a serious and recurrent psychiatric disorder characterized by cognitive symptoms, such as persistent feelings of sadness, and somatic symptoms, such as fatigue, loss of interest or pleasure. In severe cases, there may be the emergence of suicidal ideation and the interruption of simple daily activities and psychosocial functions.¹⁻³ Statistical data shows that approximately 280 million people suffer from depression and by 2030 it will be the leading cause of disability worldwide.⁴

MDD is a multifaceted disorder that can be triggered by genetic, social, and environmental factors.⁵ For this reason, the pathophysiology of depression is not yet fully understood, with various theories and evidence related to its etiology.⁵⁻⁷ For decades, the monoamine hypothesis was the most widely accepted theory for explaining this disorder. This theory suggests that depression is the result of a deficit in the biological monoamine system in the brain, such as serotonin, norepinephrine, and dopamine, as these neurotransmitters are involved in mood control.^{6, 8, 9}

Most of the existing antidepressant drugs act on the regulation of the monoamine system, with the main function of increasing the availability of these neurotransmitters, allowing them to act for longer in the Central Nervous System (CNS).^{3, 8, 10} Despite acting on the regulation of the same system, they have distinct mechanisms for this purpose and are classified according to this distinction.^{3, 11} Among the classes of antidepressants are the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (SSNRIs), monoamine oxidase inhibitors (MAOIs), and tricyclic antidepressants (TCAs).¹¹⁻¹³ However, approximately 30% of depressed individuals do not respond to pharmacological treatments, and patients who do respond may show improvement in symptoms up to 4 weeks after the start of treatment.^{3, 6, 14, 15}

These data, combined with the lack of a fully elucidated pathophysiology, demonstrate the main problems encountered in the research of psychiatric disorders.⁶

In the past decade, research on compounds containing triazoles has been conducted to evaluate the biological activities of this class of compounds.¹⁶⁻¹⁸ Among the various activities found, the class of 1,2,3-triazoles has demonstrated evidence of antidepressant activity, as it has been shown to be involved in the inhibition of serotonin reuptake and the inhibition of monoamine oxidase enzyme (MAO), two mechanisms observed in known antidepressants.^{17, 19}

In this study, the antidepressant effect of 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one (ETAP)(Figure 1), a hybrid compound containing 1,2,3-triazole and acetophenone, was evaluated in male mice. The contribution of serotonin receptors 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃, and 5-HT₄ was also investigated through the use of specific pharmacological antagonists of these receptors, as well as the need for the integrity of the serotonergic system for the effect of ETAP through serotonin depletion.

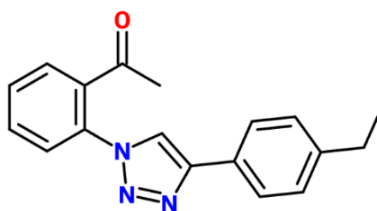


Figure 1. Chemical structure of 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one (ETAP).

2. Results and Discussion

2.1 Antidepressant-like effect of ETAP on the forced swim test and tail suspension test

The evaluation of the antidepressant-like effect of ETAP was carried out by constructing a dose-response curve through exposure of the animals to the forced

swimming test (FST) and tail suspension test (TST) after being administered with ETAP at the doses of 0.5, 1, and 5 mg/kg. Figure 2 shows the result obtained in the FST, where an increase in the latency to the first episode of immobility caused by ETAP at a dose of 1 mg/kg [$F_{(4,47)} = 9.778$, $p < 0.0001$] can be observed. A reduction in the total immobility time at the same dose [$F_{(4,47)} = 9.747$, $p < 0.0001$] was also observed when compared to the control group. The dose of 5 mg/kg also induced a reduction in immobility time when compared to the control group, demonstrating an antidepressant-like effect of ETAP. Fluoxetine (a known antidepressant of the SSRI class), used as a positive control for validation of the methodology, significantly altered both parameters when compared to the control group.

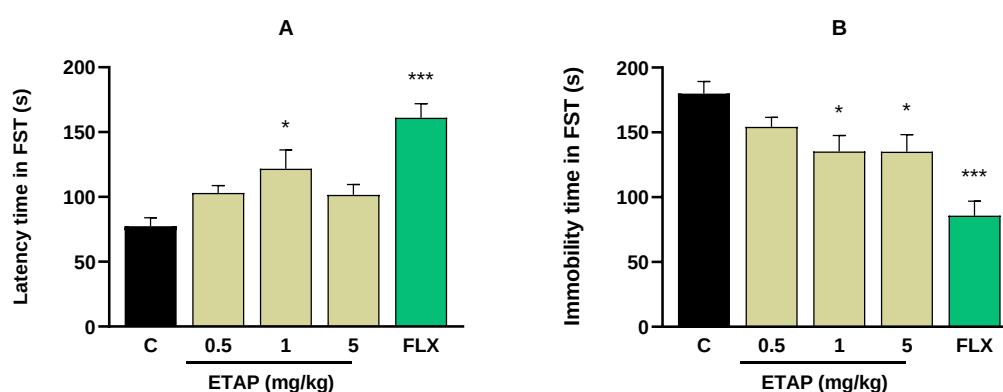


Figure 2. Acute antidepressant-like effect of ETAP and fluoxetine treatment on mice in the FST. Graphs A and B show the latency to the first episode of immobility and total immobility time, respectively, in the dose-response curve of ETAP (0.5 - 5 mg/kg; i.g., 30 minutes of pre-treatment). Fluoxetine (20 mg/kg; i.p., 30 minutes of pre-treatment) was used as a positive control for validation of the methodology used. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 10-11 animals per group. (*) $p < 0.05$ and (***) $p < 0.001$ when compared to the control group. Data analyses were carried out through One-way ANOVA/Newman-Keuls test (control and ETAP treatments) and unpaired t test (control and fluoxetine).

Similarly, the dose-response curve in the TST demonstrated the same profile of ETAP effects observed in the FST. Figure 3 shows an increase in the latency to the first

episode of immobility at doses of 1 and 5 mg/kg of ETAP [$F_{(4,49)} = 11.98$, $p < 0.0001$], with a reduction in the total immobility time at the same doses [$F_{(4,49)} = 3.957$, $p = 0.0073$] when compared to the control group, showing once more the antidepressant-like effect of ETAP. In accordance with the result obtained through exposure of the animals to the FST, fluoxetine presented statistical alteration in both evaluated parameters, characterizing its antidepressant effect, and validating the protocol used.

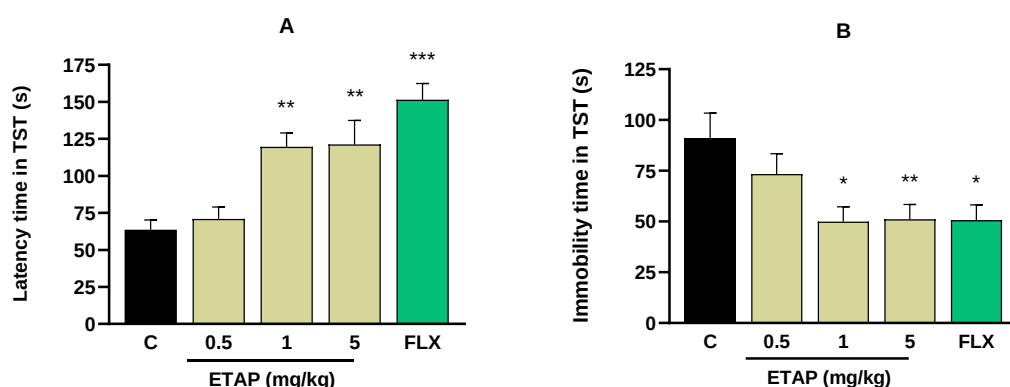


Figure 3. Acute antidepressant-like effect of ETAP and fluoxetine treatment on mice in the TST. Graphs A and B show the latency to the first episode of immobility and total immobility time, respectively, in the dose-response curve of ETAP (0.5 - 5 mg/kg; i.g., 30 minutes of pre-treatment). Fluoxetine (20 mg/kg; i.p., 30 minutes of pre-treatment) was used as a positive control for validation of the methodology used. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 10-12 animals per group. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, and (***) $p < 0.001$ when compared to the control group. Data analyses were carried out through One-way ANOVA/Newman-Keuls test (control and ETAP treatments) and unpaired t test (control and fluoxetine).

Behavioral tests for the evaluation of depressive behavior through despair are largely used in the analysis of the antidepressant-like effect of drugs in preclinical procedures, with the FST and TST as the most used tests in this research.²⁰ In these tests, parameters related to the mobility of the animal, such as the latency to the first episode of immobility and total immobility time, are evaluated. These parameters reflect the despair behavior found in human depression, in accordance with face validity, one of the necessary criteria for the validation of an animal experimental model.^{15, 21, 22} The start of

the evaluation in the execution of despair behavioral tests shows that the animal exhibits a behavior of escape, where it tries to escape the stress situation to which it is exposed. Over time, the animal adopts an immobile behavior, which is related to depressive behavior.^{22,23} An increase in the latency to the first episode of immobility, combined with a reduction in the total immobility time over the course of the test, indicates that the evaluated drug presented an antidepressant-like effect.²³

Therefore, the results obtained in this study suggest an antidepressant-like effect of ETAP, observed in both FST and TST. The pharmacological action of ETAP was only evaluated in male mice. The choice of only one sex for the investigation of the antidepressant-like effect of ETAP was based on literature²⁴⁻²⁷ that demonstrates the evaluation of pharmacological properties of candidates for new drugs being tested more frequently in male animals, presenting good reproducibility. However, we intend to expand this research to female animals in future studies.

Table 1 shows that in the open field test (OFT) there is no statistically significant alterations in the parameters number of crossings [$F_{(4,47)} = 0.0541$] and rearings [$F_{(4,47)} = 0.0215$] among the groups, with the exception of the number of rearings in the FLX group, which showed a reduction when compared to the other groups, in accordance with data found in the literature.²⁸ The obtained data indicate that treatment with ETAP did not alter the locomotor and exploratory activities of the animals at any of the tested doses.

Table 1. Effects of different doses of ETAP in the OFT.

Group	Number of Crossings	Number os Rearings
Control	75.27 ± 2.49	33.36 ± 2.51
ETAP 0.5	73.46 ± 5.25	33.54 ± 3.12
ETAP 1	79.30 ± 3.31	34.40 ± 3.70
ETAP 5	76.55 ± 3.82	36.00 ± 2.29

FLX	74.10 ± 7.72	21.20 ± 3.09**
-----	--------------	----------------

The results represent the means ± S.E.M. of 10-11 mice/group. (**) $p < 0.01$ when compared to the control group. Data analyses were carried out through One-way ANOVA/Newman-Keuls test (control and ETAP treatments) and unpaired t test (control and fluoxetine).

The results obtained in the OFT indicate that the behavioral alterations observed in the FST and TST are not the result of a psychoactive effect, suggesting an antidepressant-like effect generated by ETAP. To exclude the possibility that the anti-immobility effect generated by treatment with ETAP was caused by the execution of the OFT prior to the behavioral test to evaluate depressive behavior, the OFT was not performed prior to the execution of the TST. As can be seen in the results of Figure 3, there was an increase in latency to the first episode of immobility, as well as a reduction in total immobility time at doses that presented antidepressant-like effect when compared to the control group, indicating that the anti-immobility effect is generated by treatment with ETAP.

To ensure the effectiveness of the experimental protocol, fluoxetine was used as a positive control. Fluoxetine is an antidepressant drug already approved for use with proven antidepressant effect.²⁹ Animals in the FLX group, treated with fluoxetine, were exposed to the same procedures as the animals in the other groups. The results obtained in the behavioral tests for the FLX group also showed an anti-immobility effect, as can be observed in other research^{24, 25, 28}, proving the effectiveness of the protocol. It is worth noting that, for this research, fluoxetine was also only used as a positive control to validate the methodology used and not for comparison of effects with ETAP.

Despite ETAP showed antidepressant-like effect in both tests and at doses of 1 and 5 mg/kg, to evaluate the involvement of different serotonergic receptors in its effect,

TST and the dose of 1 mg/kg were chosen, as ETAP presented better results in the TST and the dose of 1 mg/kg is the lower dose with antidepressant-like effect.

2.2 Contribution of serotonergic system in the antidepressant-like effect of ETAP

In this study, to assess whether the antidepressant-like effect of ETAP (1 mg/kg) is dependent on the integrity of the serotonergic system, the animals were treated with *p*-chlorophenylalanine (*p*-CPA, 100 mg/kg, i.p.), a serotonin depletor. Additionally, the involvement of this system in the antidepressant-like action of ETAP in the TST was evaluated from the pre-treatment of specific serotonin receptor antagonists WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.), ketanserin (1 mg/kg, i.p.), ondansetron (1 mg/kg, i.p.) and GR113808 (0.1 mg/kg, i.p.), in order to evaluate the involvement of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors, respectively.

To evaluate the antidepressant-like effect of ETAP in the face of serotonin depletion, animals were pre-treated with *p*-CPA. The results obtained can be seen in Figure 4, which shows that pre-treatment with *p*-CPA resulted in a blockade of the antidepressant-like effect of ETAP, since it prevented it from generating an increase in the latency time [$F_{(1,30)} = 10,65$, $p = 0.0028$] and a reduction in immobility time [$F_{(1,30)} = 4,871$, $p = 0.0351$], previously demonstrated. Pre-treatment with *p*-CPA did not result in changes in the locomotor and exploratory activities of the animals in any of the evaluated groups ($p > 0.05$), as can be seen in Table 2.

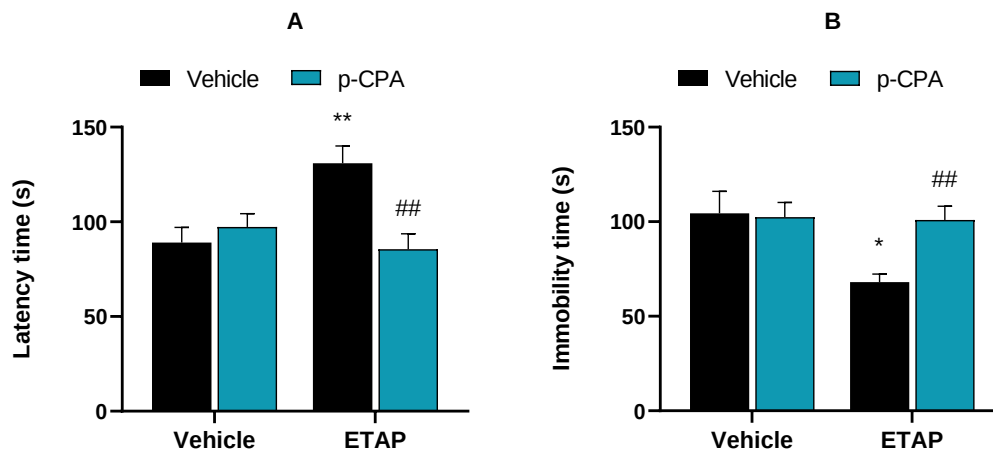


Figure 4. Effect of 5-HT depletion (*p*-CPA - 100 mg/kg, i.p., an inhibitor of tryptophan hydroxylase) on the antidepressant-like action of ETAP in mice in the TST (graphs A and B show the latency for the first episode of immobility and the total immobility time, respectively). *p*-CPA was administered for 4 days before behavioral analysis. On the fifth day, animals were treated with ETAP and exposed to the TST 30 minutes after administration of ETAP. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 9-11 animals per group. (*) $p < 0.05$ and (**) $p < 0.01$ when compared to the control group. (##) $p < 0.01$ when compared to the ETAP group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc).

Table 2. Effects of ETAP and/or *p*-CPA in the OFT.

Group	Number of Crossings	Number of Rearings
Control	63.73 $\pm$ 3.81	25.73 $\pm$ 2.52
ETAP 1	72.33 $\pm$ 6.47	32.45 $\pm$ 4.74
<i>p</i> -CPA	76.82 $\pm$ 3.39	27.91 $\pm$ 2.07
ETAP 1 + <i>p</i> -CPA	60.00 $\pm$ 5.56	21.36 $\pm$ 2.78

The results represent the means $\pm$ S.E.M. of 9-11 mice/group. Data analyses were carried out through Two-way ANOVA.

Inhibition of tryptophan hydroxylase by administration of *p*-CPA reduces brain serotonin levels in mice by approximately 60%.³⁰ This makes it possible to evaluate whether the antidepressant effect caused by the tested molecule depends on the intact serotonergic system, as demonstrated in several studies.³¹⁻³³ According to the results

obtained, serotonin depletion blocked the anti-immobility effect of ETAP, suggesting that the presence of serotonin is essential for the pharmacological action of the molecule. The dose of *p*-CPA used was able to reduce serotonin levels without causing measurable depressive symptoms based on the parameters evaluated in the behavioral tests, since it did not have a *per-se* effect and maintained parameters similar to those of the control group, but is effective in blocking the antidepressant effect of serotonergic drugs.³⁴

The results obtained from pre-treatment with WAY100635 are shown in Figure 5. These results show that ETAP at the dose of 1 mg/kg demonstrated an antidepressant-like effect on both evaluated parameters [$F_{(1,27)} = 4.849$, $p = 0.0364$; $F_{(1,27)} = 18.99$, $p = 0.0002$; latency for the first episode of immobility and total immobility, respectively], confirming the results obtained previously by the dose-response curve. The pre-treatment with WAY100635 did not alter the antidepressant-like effect of ETAP in TST, since it did not statistically alter latency to the first episode of immobility [$F_{(1,27)} = 0.5592$, $p = 0.4610$] and total immobility time [$F_{(1,27)} = 0.1696$, $p = 0.6837$] parameters, showing that the 5-HT_{1A} receptor is not involved in the antidepressant-like action of ETAP.

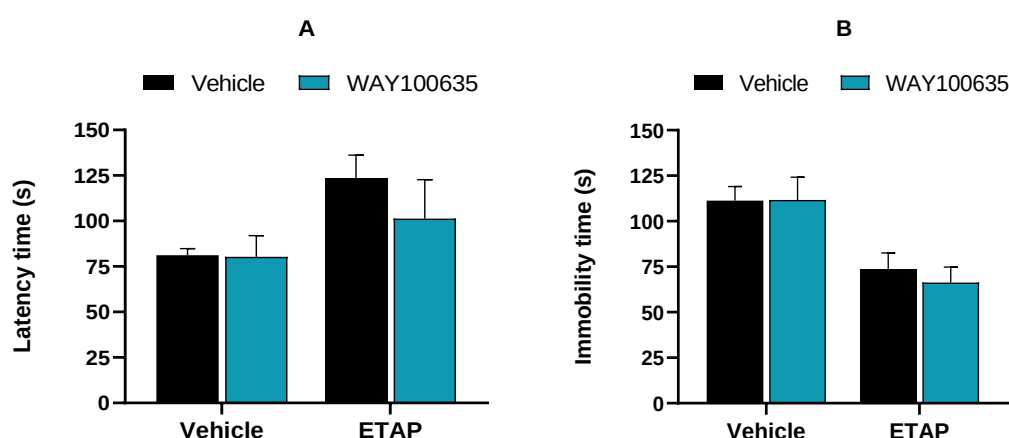


Figure 5. Effect of pre-treatment with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a specific antagonist of the 5-HT_{1A} receptor) on the antidepressant-like action of ETAP (1 mg/kg, i.g.) in mice in TST (graphs A and B show the latency for the first episode of immobility and total immobility time, respectively). WAY100635 was administered 15 minutes before ETAP and TST was performed 30 minutes after

ETAP administration. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 7-9 animals per group (two-way ANOVA).

To evaluate whether the WAY100635 – ETAP interaction would not result in a locomotor deficit in the animals, the OFT was used. The results obtained are expressed in Table 3 and show that there was no statistical difference in the comparison among the treated groups ($p > 0.05$), demonstrating that the interaction of a pre-treatment with WAY100635 and ETAP does not alter the locomotor and exploratory activities of treated animals.

Table 3. Effects of ETAP and/or WAY100635 in the OFT.

Group	Number of Crossings	Number os Rearings
Control	73.18 $\pm$ 4.75	37.55 $\pm$ 3.53
ETAP 1	82.80 $\pm$ 5.75	46.11 $\pm$ 4.63
WAY100635	75.42 $\pm$ 4.18	35.08 $\pm$ 2.91
ETAP 1 + WAY100635	69.27 $\pm$ 6.57	49.09 $\pm$ 5.13

The results represent the means $\pm$ S.E.M. of 7-9 mice/group. Data analyses were carried out through Two-way ANOVA.

The pre-treatment with ketanserin blocked the antidepressant-like effect of ETAP demonstrated previously. The results presented in Figure 6 show that the blockade of the 5-HT_{2A/2C} receptor by the pre-treatment with ketanserin prevented ETAP from generating its anti-immobility effect based on the observation of latency [$F_{(1,28)} = 5.236$, $p = 0.0299$] and immobility [$F_{(1,28)} = 4.335$, $p = 0.0466$] parameters, suggesting that this receptor is involved in its antidepressant action.

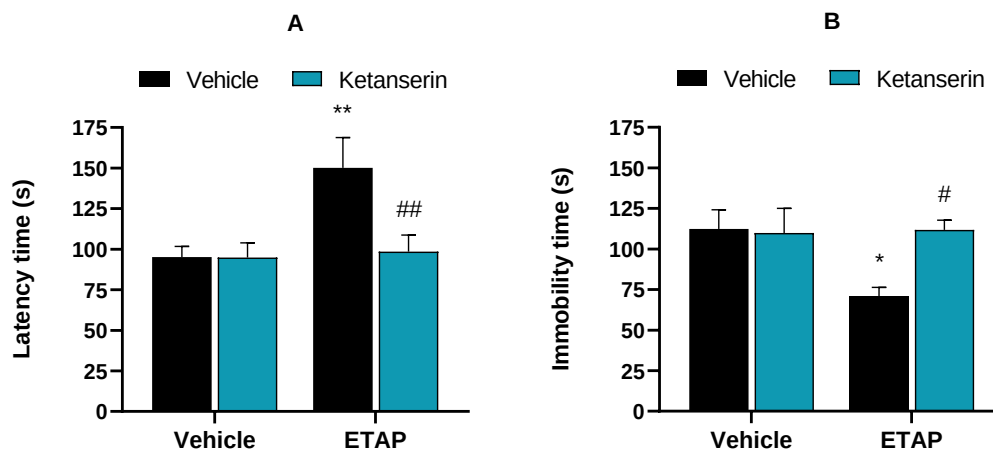


Figure 6. Effect of the pre-treatment with ketanserin (1 mg/kg, i.p., an antagonist of the 5-HT_{2A/2C} receptor) on the antidepressant-like action of ETAP (1 mg/kg, i.g.) in TST (graphs A and B show the latency for the first episode of immobility and the total immobility time, respectively). Ketanserin was administered 15 minutes before ETAP and TST was performed 30 minutes after ETAP administration. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 11-12 animals per group. (*) $p < 0.05$ and (**) $p < 0.01$ when compared to the control group. (#) $p < 0.05$ and (##) $p < 0.01$ when compared to the ETAP group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc).

The interaction between ketanserin and ETAP did not alter the locomotor and exploratory activities of the animals since there was no statistical difference in the number of crossings and rearings among the evaluated groups ($p > 0.05$), as observed by the exposure of the animals to OFT. The results can be observed in Table 4.

Table 4. Effects of ETAP and/or ketanserin in the OFT.

Group	Number of Crossings	Number of Rearings
Control	62.27 $\pm$ 3.43	31.00 $\pm$ 3.91
ETAP 1	53.27 $\pm$ 3.52	25.18 $\pm$ 2.87
Ketanserin	51.25 $\pm$ 3.10	30.09 $\pm$ 2.58
ETAP 1 + Ketanserin	51.91 $\pm$ 2.84	25.55 $\pm$ 2.32

The results represent the means $\pm$ S.E.M. of 11-12 mice/group. Data analyses were carried out through Two-way ANOVA.

Some studies³⁵⁻³⁸ suggest that agonists of 5-HT_{2A} receptors have rapid-acting antidepressant effects in clinical and preclinical studies, indicating that mechanisms involving this receptor may be an alternative pathway for rapid antidepressant action. This rapid action may be related to an increase in synaptic plasticity in cortical neurons, therefore increasing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression, generated by activation of 5-HT_{2A} receptors. This modulation is observed in the frontal cortex, but is not observed in the hippocampus region.³⁹ Additionally, genetic dysfunction of 5-HT_{2A} receptors hinders the antidepressant action of SSRIs.⁴⁰

Furthermore, 5-HT_{2C} receptors are frequently evaluated as therapeutic targets for depression, presenting a contradiction between agonists and antagonists in preclinical evaluations.^{41, 42} Rosenzweig⁴² shows that agonists of this receptor have effects like SSRIs, leading to a reduction in immobility time in animals submitted to FST. On the other hand, some studies⁴³⁻⁴⁵ demonstrate the same effect with 5-HT_{2C} antagonists and potentiate the effect of SSRI drugs, making the association of this class of drugs with antagonists of this receptor more effective than the isolated use of antidepressants.^{44, 45}

For the evaluation of the involvement of the 5-HT₃ receptor with the antidepressant-like effect of ETAP, the tested animals were pre-treated with ondansetron. The results obtained did not show any interaction between ondansetron pre-treatment and ETAP. The blockade of the 5-HT₃ receptor did not block the antidepressant-like behavior of ETAP, suggesting that this receptor is not involved in its action. This information can be affirmed by the statistical unchanged of the latency and total immobility parameters [$F_{(1,32)} = 1,251$, $p = 0.2716$; [$F_{(1,32)} = 0.1341$, $p = 0.7166$; respectively] observed in Figure 7.

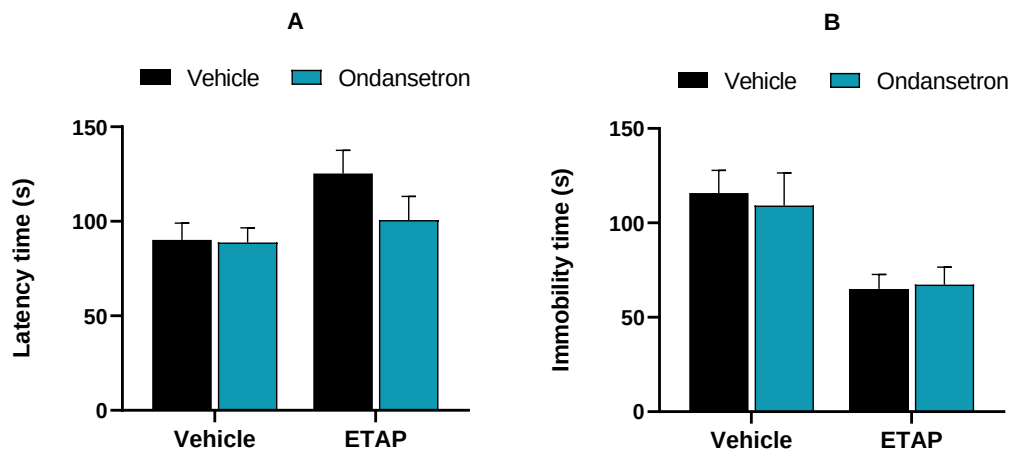


Figure 7. Effect of ondansetron pre-treatment (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist) on the antidepressant-like action of ETAP (1 mg/kg, i.g.) in TST (graphs A and B show latency to the first episode of immobility and total immobility time, respectively). Ondansetron was administered 15 minutes before ETAP and TST was performed 30 minutes after ETAP administration. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 11 animals per group (two-way ANOVA).

Locomotor and exploratory activities were also not altered by the ondansetron – ETAP interaction, as there was no difference between the groups in the evaluated parameters ($p > 0.05$) with exposure of the animals to OFT, as demonstrated in Table 5.

Table 5. Effects of ETAP and/or ondansetron in the OFT.

Group	Number of Crossings	Number of Rearings
Control	65.09 $\pm$ 4.66	33.09 $\pm$ 2.97
ETAP 1	69.36 $\pm$ 2.29	38.36 $\pm$ 2.32
Ondansetron	58.09 $\pm$ 4.53	29.36 $\pm$ 2.57
ETAP 1 + Ondansetron	65.64 $\pm$ 4.01	33.36 $\pm$ 2.80

The results represent the means $\pm$ S.E.M. of 11 mice/group. Data analyses were carried out through Two-way ANOVA.

The pre-treatment with GR113808 was able to block the antidepressant-like effect of ETAP. As GR113808 is an antagonist of 5-HT₄ receptors, the loss of the

antidepressant-like effect of ETAP in the face of pre-treatment with this antagonist suggests that this receptor is involved in the effect generated by this molecule. The results shown in Figure 8 show a block in the ability of ETAP to generate an increase in the latency time [$F_{(1,39)} = 5,652$, $p = 0.0224$] with a reduction in the immobility time [$F_{(1,39)} = 5,544$, $p = 0.0237$], when compared to the control group, through pre-treatment with GR113808.

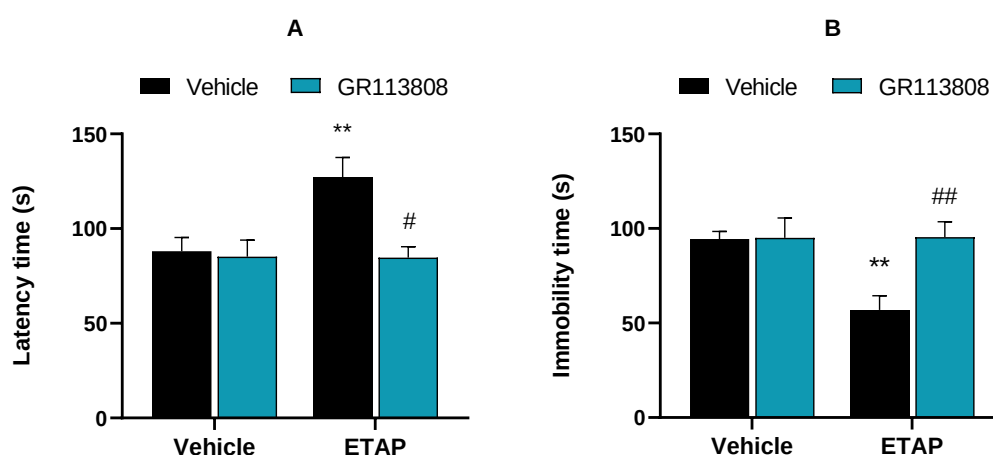


Figure 8. Effect of pre-treatment with GR113808 (0.1 mg/kg, i.p., an antagonist of the 5-HT₄ receptor) on the antidepressant-like action of ETAP (1 mg/kg, i.g.) in the TST (graphs A and B show the latency for the first episode of immobility and the total immobility time, respectively). GR113808 was administered 15 minutes before ETAP and the TST was performed 45 minutes after administration of ETAP. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 9-11 animals per group. (**) $p < 0.01$ when compared to the control group. (#) $p < 0.05$ and (##) $p < 0.01$ when compared to the ETAP group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc).

The GR113808 – ETAP interaction did not alter crossing and rearing parameters, suggesting that there is no change in the locomotor and exploratory activities of the animals when compared among the evaluated groups ($p > 0.05$), as shown in Table 6.

Table 6. Effects of ETAP and/or GR113808 in the OFT.

Group	Number of Crossings	Number of Rearings
-------	---------------------	--------------------

Control	70.90 ± 7.18	31.20 ± 3.69
ETAP 1	64.22 ± 7.90	32.11 ± 4.56
GR113808	84.56 ± 8.86	38.22 ± 3.57
ETAP 1 + GR113808	76.22 ± 9.12	33.33 ± 4.52

The results represent the means ± S.E.M. of 9-11 mice/group. Data analyses were carried out through Two-way ANOVA.

Some studies⁴⁶ show that the activation of 5-HT₄ receptors is responsible for the production of antidepressant activity, while the blockade of this receptor makes it difficult for SSRIs to work.⁴⁷ This action is related to the involvement of the activation of the 5-HT₄ receptor with the neurogenic effect of this class of drugs.⁴⁶⁻⁴⁸ Like for 5-HT_{2A/2C} receptors, several preclinical studies^{46, 49, 50} suggest that agonists of 5-HT₄ receptors have rapid-acting antidepressant effects, as they are able to reduce the total immobility time of animals in the FST and TST⁵¹, and increase the preference for sucrose in the sucrose preference test, which is a test for evaluating depressive behavior through anhedonia.¹⁵

Some biological evidence also suggests that partial agonists of the 5-HT₄ receptor have a rapid antidepressant effect by increasing neuroplasticity through increased expression of cAMP response element-binding protein (CREB), BDNF, and neurogenesis proteins^{46, 49, 52}, resulting in an increase in the complexity of dendritic arborization and maturation of hippocampal dendritic spines.^{53, 54} Unlike what is observed for the 5-HT_{2A} receptor, the biological changes observed with activation of the 5-HT₄ receptor by partial agonists are seen in the hippocampus, but not in the frontal cortex.³⁹

Furthermore, a previous study¹⁹ shown that ETAP has the ability to inhibit MAO, an enzyme responsible for the degradation of the biological monoamines serotonin, norepinephrine, and dopamine. MAO is found in two isoforms in the organism, MAO-A

and MAO-B, with MAO-A being the isoform that has the highest affinity for degrading serotonin and MAO-B has higher affinity to dopamine.⁵⁵ Inhibition of the activity of this enzyme implies a greater availability of biological monoamines to carry out their activities in the CNS, reducing the depressive phenotype, as suggested by the monoaminergic hypothesis.⁷ MAOIs have been used as antidepressants, more frequently in refractory depressed patients, i.e., patients who do not respond to other antidepressant pharmacotherapies.⁵⁶ The results obtained by Costa¹⁹ suggest that this inhibition is non-selective, as it was able to inhibit both isoforms of MAO. However, the data obtained for the average inhibitory concentration (IC₅₀) regarding isoform A were lower when compared to MAO-B, suggesting a concentration-dependent selectivity. The inhibition of this enzyme may be related to the anti-immobility effect observed with the administration of ETAP. However, whether ETAP inhibited MAO activity after the administration to mice remains to be determined. The results presented by Costa¹⁹ are in line with the data published by Singh¹⁷, which suggest that compounds from the 1,2,3-triazole class are involved in the inhibition of MAO.

Depression is more commonly reported in females⁵⁷. Therefore, we will follow up on research on ETAP by expanding the evaluation of the mechanism of action to other neural systems, as well as evaluating the antidepressant effect in female mice. ETAP effect will also be evaluated in other animal models of induction to investigate the behavior of this molecule in relation to other evidence related to depression, and to evaluate other possible biological activities.

2.3 ETAP has low potential to cause acute toxicity to mice

As a novel molecule that showed an antidepressant-like effect in a preclinical model, we followed up on research on the possible toxic effects of ETAP. The results obtained through the experimental protocol for acute oral toxicity can be seen in Figure

9. Administration of ETAP (50 mg/kg, i.g.) did not cause mortality or general signs of toxicity in female mice during the 14 days of observation. Necropsy, carried out after euthanasia, allowed for the observation of normal tissues in animals treated with ETAP. It was possible to observe no statistical changes in water consumption ($t = 1.527$, $df = 2$, $p = 0.2663$), food intake ($t = 1.200$, $df = 2$, $p = 0.3529$), body weight ($t = 0.8329$, $df = 10$, $p = 0.9353$), crossings ($t = 1.349$, $df = 10$, $p = 0.2072$) and rearings ($t = 1.854$, $df = 10$, $p = 0.0934$) when compared to animals treated with ETAP with the control animals. Biochemical analyses showed that ETAP did not cause plasma changes in aspartate aminotransferase (AST) activity ($t = 0.6281$, $df = 10$, $p = 0.5440$), urea ($t = 0.9043$, $df = 10$, $p = 0.3871$), but caused a reduction in alanine aminotransferase (ALT) activity in the ETAP-treated group ($t = 2.742$, $df = 10$, $p = 0.0208$) when compared to the control group. These results demonstrated that ETAP has low potential to cause toxic effects after acute exposure.

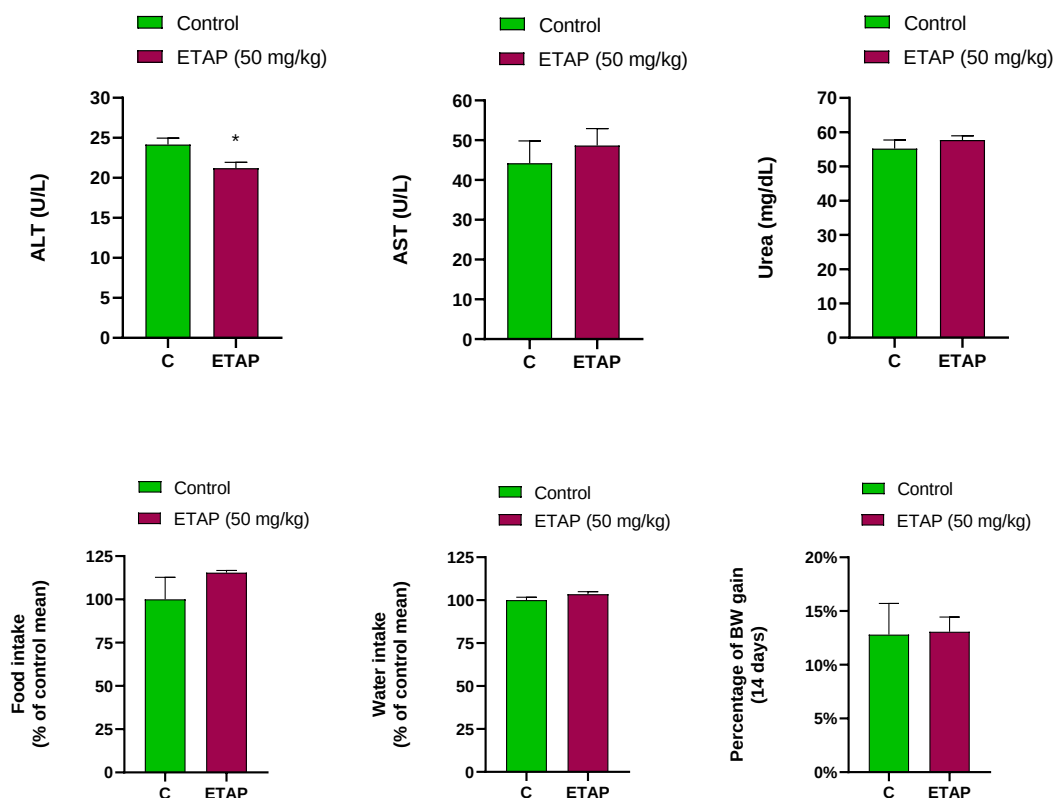


Figure 9. General toxicity parameters in female mice exposed to a single dose of ETAP (50 mg/kg, i.g.). Water and food consumption represent data obtained from 2 cages/groups containing 3 animals per cage. Statistical analyses were performed using an unpaired t-test. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean of 6 animals per group. (*) $p < 0.05$ when compared to the control group.

Unlike the behavioral analyses, the acute oral toxicity test was performed on female mice. This choice was made based on the recommendation of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), which we used as the methodology to be followed. The organization states that the use of only one sex is sufficient for toxicity testing, but recommends the use of female animals because they are more sensitive to this experimental protocol compared to male animals.⁵⁸

Based on the data presented in this study, we consider ETAP to be of great interest as a candidate for future new antidepressant drugs, as it is a novel hybrid molecule

containing 1,2,3-triazole and acetophenone that showed antidepressant-like effects and low toxicity in preclinical analyses.

3. Conclusions

The data presented in this study provide the first evidence of antidepressant-like action by administration of ETAP in mice. Investigation of serotonergic system involvement showed that ETAP antidepressant-like action depends on the integrity of the system and may be related to modulation of 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₄ receptors. Administration of ETAP did not alter the animals locomotor and exploratory activities, indicating that the anti-immobility effect shown is not the result of psychomotor alteration. In addition, ETAP showed low potential for generating adverse effects. In this way, ETAP could be an interesting molecule for the development of new therapeutic strategies for MDD.

4. Materials and Methods

4.1 Animals

The experiments were carried out on male Swiss mice (25-30g; N=8-12 animals per group), except for the acute oral toxicity analysis, which was carried out on female mice. The animals were provided by the Central Bioterium of Federal University of Pelotas (UFPEL). Each animal was used only once and were kept in a room at 22 ± 1 °C, with free access to water and food, a 12h light/dark cycle and lights on at 7:00. One hour before each behavioral experiment, the animals were relocated to the room where the behavioral tests were performed to acclimate to the location. Before the behavioral tests, the animals were handled only for weighing, identification by marking on the tails, and administration of drugs. The experiments were carried out following the guidelines of

the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA 50890-2019) of UFPEL and the national institute of health guidelines for the use of laboratory animals.

4.2 Drugs

ETAP was synthesized in the Laboratory of Clean Organic Synthesis (LASOL), located at UFPEL, and analysis by Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C and ^1H -NMR) showed analytical and spectroscopic spectra in agreement with the assigned structure. Fluoxetine was purchased from EMS Pharmaceuticals/Brazil and dissolved in saline (0.9%). All other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) or other standard commercial suppliers. ETAP was dissolved in canola oil and administered via intragastric (i.g.) route. WAY100635, ketanserin, and ondansetron were dissolved in saline solution (0.9%). GR113808 and *p*-chlorophenylalanine (*p*-CPA) were dissolved in a suspension solution (carboxymethyl cellulose (CMC) 0.5 + Tween 80 0.1%). For all experiments, drugs were administered in a constant volume of 10 ml/kg of body weight.

4.3 Experimental Design

4.3.1 Response-Dose Curve

The antidepressant-like effect of different doses of ETAP was evaluated by the FST and TST to construct a dose-response curve. For this analysis, mice were divided into five groups: (1) Control (canola oil, i.g.); ETAP 0.5 (ETAP, 0.5 mg/kg, i.g.); ETAP 1 (ETAP, 1 mg/kg, i.g.); ETAP 5 (ETAP, 5 mg/kg, i.g.); and FLX (Fluoxetine, 20 mg/kg, i.p.). ETAP, canola oil, or fluoxetine were administered 30 minutes before the FST and TST were performed. The animal's locomotor and exploratory activities were evaluated in the OFT, 4 minutes before the FST, to exclude any interference from a possible alteration of locomotion on the antidepressant-like effect of ETAP. The experimental design for constructing the dose-response curve can be seen in Figure 10. The pre-treatment

time of 30 minutes with ETAP was based on previous.^{24, 25, 28} Each animal was used only once in each test. The tests were observed by a blinded investigator. Each experiment was run 3-4 times to achieve the total number of animals per group.

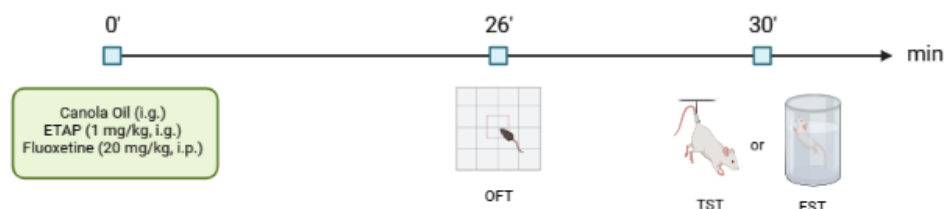


Figure 10. Illustration of the experimental design for constructing the dose-response curve in the FST and TST. The figure shows the time of drug administration and behavioral testing in mice. ETAP: 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one; i.g.: intragastric; i.p.: intraperitoneal; FST: forced swimming test; TST: tail suspension test; OFT: open field test.

4.3.2 Involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of ETAP

To investigate the possible contribution of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of ETAP, the TSC was used. For this analysis, different sets of behavioral experiments were performed with an enzyme inhibitor and different serotonin receptor antagonists: *p*-CPA (100 mg/kg, i.p., an inhibitor of the enzyme tryptophan hydroxylase), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a specific antagonist of the 5-HT_{1A} receptor), ketanserin (1 mg/kg, i.p., an antagonist of the 5-HT_{2A/2C} receptors), ondansetron (1 mg/kg, i.p., an antagonist of the 5-HT₃ receptor) and GR113808 (0.1 mg/kg, i.p., an antagonist of the 5-HT₄ receptor). To evaluate the involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of ETAP, *p*-CPA was administered for 4 days, always at the same time, and on the fifth day, 24 hours after the last treatment with *p*-CPA, ETAP was administered. The TST was performed 30 minutes

after ETAP administration, as shown in Figure 11A. In the analysis with WAY100635, ketanserin, and ondansetron, ETAP was administered 15 minutes after pre-treatment with antagonists and, 30 minutes after ETAP administration, the TST was performed, as shown in Figure 11B. For the analysis with GR113808, ETAP was administered 30 minutes after pre-treatment with the antagonist. The TST was performed 30 minutes after treatment with ETAP, as shown in Figure 11C. For all experiments, ETAP was administered at a dose of 1 mg/kg, intragastrically, and the OFT was performed 4 minutes before each TST. The doses and treatment time of each serotonin receptor antagonist used were based on previous studies.^{24, 25, 28}

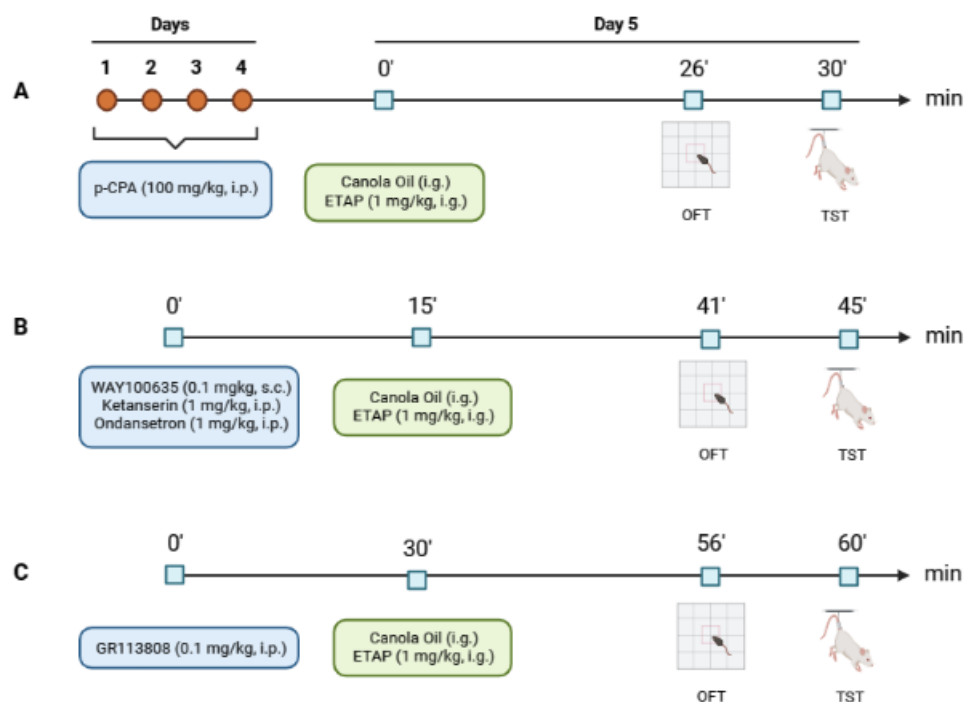


Figure 11. Illustration of the experimental design for the evaluation of the involvement of the serotonergic system in the antidepressant action of ETAP. (A) demonstrates the protocol used to evaluate the effect of ETAP against serotonin depletion using the enzymatic inhibitor; (B) demonstrates the protocol used to evaluate the effect of ETAP on 5-HT₁, 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₃ receptors using its antagonists; (C) demonstrates the protocol used to evaluate the effect of ETAP on the 5-HT₄ receptor using its antagonist. The figure shows the time of drug administration and behavioral tests in mice. ETAP: 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))phenyl)ethan-1-one; i.g.: intragastric; i.p.: intraperitoneal; TST: tail suspension test; OFT: open field test.

4.4 Behavioral testing

4.4.1 Forced swimming test (FST)

The FST consists of placing the animals, individually, in a cylindrical container (d = 10 cm, h = 25 cm, containing 1.5 L of water) at a controlled temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, for 6 minutes. Because it is a test to evaluate depressive behavior through despair, the evaluated parameters are related to the animal's mobility and immobility during the test time. The latency for the first episode of immobility and the total immobility time during the 6 minutes were evaluated, according to the methodology described by Porsolt.⁵⁹ The animal is considered immobile when it only performs movements sufficient to remain with its head out of the water, without attempting to escape. The water was changed at the end of each test so as not to interfere with the other tested animals.

4.4.2 Tail suspension test (TST)

The TST consists in suspending the animals individually by their tails on an apparatus 50 cm from the ground, using a piece of adhesive tape. Like the FST, this is a test for evaluating depression-like behavior through despair. Therefore, the parameters evaluated were also the latency for the first episode of immobility and the total time of immobility. The test was conducted for 6 minutes, according to Steru.⁶⁰

4.4.3 Open field test (OFT)

The OFT consists of placing the animals, individually, in the center of a wooden apparatus (30 cm x 40 cm x 40 cm) divided into 9 equal squares, which were observed for 4 minutes according to the Walsh methodology.⁶¹ The evaluated parameters were number of crossings, related to locomotor activity, and number of rearing, related to exploratory activity. At the end of each OFT, the apparatus was cleaned with 20% alcohol to eliminate potential interferents for the other animals.

4.5 Oral acute toxicity

Acute oral toxicity was evaluated as described in OECD guideline number 423 (2001) using female Swiss mice. The animals were housed in an experimental handling room for acclimation. After 7 days, the animals received ETAP (50 mg/kg, i.g.) or its vehicle (N = 6 animals per group, divided into 2 sets) and were observed individually every 30 minutes for 4 hours after administration. During the following 14 days, the animals were observed once a day at the same time as the first day of treatment to evaluate general signs of toxicity, body weight gain, and water and food intake. At the end of the 14 days of observation, the animals were subjected to the OFT to evaluate locomotor and exploratory activity. The animals were then sedated with excess isoflurane and had their blood collected by cardiac puncture to analyze plasma AST and ALT enzyme activities and measure urea levels. Plasma checks were performed by colorimetric enzyme methods following the procedures described in commercial kits (Labtest Diagnostica, MG, Brazil).

4.6 Data presentation and statistical analyses

The experimental results were analyzed using GraphPad Prism software version 8.0.1 and expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Normal distribution of the data was evaluated using the D'Agostino & Pearson test. Comparison between the experimental groups was performed using one-way ANOVA (for construction of the dose-response curve) or two-way ANOVA (to evaluate the effect of antagonist pre-treatment and/or ETAP), as appropriate, followed by the Newman Keuls post-hoc test. The positive control fluoxetine was compared with control group through t-test. For toxicity data analysis, the t-test was also applied. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

5. Abbreviations

ALT: Alanine Aminotransferase

ANOVA: Analysis of Variance

AST: Aspartate Aminotransferase

CNS: Central Nervous System

ETAP: 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1h-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one

FST: Forced Swimming Test

MAO: Monoamine Oxidase

MAOI: Monoamine Oxidase Inhibitors

OFT: Open Field Test

***p*-CPA:** *p*-chlorophenylalanine

SSRI: Selective Serotonin Reuptake Inhibitors

TST: Tail Suspension Test

6. Author information

Marcelo Heinemann Presa – E-mail: marcelorpesa123@gmail.com

César Augusto Brüning – E-mail: cabruning@yahoo.com.br

Cristiani Folharini Bortolatto – E-mail: cbortolatto@gmail.com.

6.1 Authors Contributions

- Synthesis and characterization of ETAP: Gabriel Pereira da Costa and Diego Alves.
- Design of experiments: Marcelo Heinemann Presa and César Augusto Brüning.
- Performed the experiments and wrote the original draft preparation: Marcelo Heinemann Presa, Marcia Juciele da Rocha, Camila Simões Pires and Kauane Nayara Bahr de Ledebuhr.

- Supervision, review and editing: César Augusto Brüning, Diego Alves and Cristiani Folharini Bortolatto.

6.2 Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

7. Recognition

We thank the Universidade Federal de Pelotas (UFPel) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, grant numbers 21/2551-0000728-1 and 21/2551-0000614-5) for the financial support. This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

8. References

1. Z, L.; M, R.; J, C.; Y, F., Major Depressive Disorder: Advances in Neuroscience Research and Translational Applications. *Neuroscience bulletin* **2021**, 37 (6).
2. E, I.; C, K.; A, S., Persistent depressive symptoms, HPA-axis hyperactivity, and inflammation: the role of cognitive-affective and somatic symptoms. *Molecular psychiatry* **2020**, 25 (5).
3. TD, G.; CA, Z.; SM, T., Molecular Pharmacology and Neurobiology of Rapid-Acting Antidepressants. *Annual review of pharmacology and toxicology* **2019**, 59.
4. WHO Depression.
5. PA, Z.; C, A.; A, C.; LA, C.; CM, P., Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2011**, 35 (3).
6. GS, M.; JJ, M., Depression. *Lancet (London, England)* **2018**, 392 (10161).
7. L, P.-C.; S, T.-S.; C, R.-L.-A.; F, G.-S.; JA, M.; E, B., Monoaminergic system and depression. *Cell and tissue research* **2019**, 377 (1).
8. C, F.; Z, Z.; H, X.; Y, L.; X, W.; L, Y.; Y, X.; Z, Z.; A, Z.; A, S.; M, L., Natural Products for the Treatment of Post-stroke Depression. *Frontiers in pharmacology* **2022**, 13.
9. M, C.-C.; V, N.; M, N.; Á, O.; M, R.; V, B.; J, R.-Q., Depression as a Neuroendocrine Disorder: Emerging Neuropsychopharmacological Approaches beyond Monoamines. *Advances in pharmacological sciences* **2019**, 2019.
10. X, P.; L, C.; W, X.; S, B.; J, W.; X, C.; S, G.; K, L.; S, A.; M, Z.; R, C., Activation of monoaminergic system contributes to the antidepressant- and anxiolytic-like effects of J147. *Behavioural brain research* **2021**, 411.
11. Cruz, A. F. P. d.; Melho, V. M.; Souza, B. F. X. D.; Silva, G. R.; Silva, P. E. E. M.; Carvalho, S. J., Antidepressant drugs. <https://revistacientifica.crfmg.emnuvens.com.br/crfmg> **2020**.
12. ZD, C.; RJ, D., Treatment Selection in Depression. *Annual review of clinical psychology* **2018**, 14.
13. Philip Boyce, C. M., Choosing an antidepressant. **2022**.
14. JP, P., Challenges of Treatment-resistant Depression. *Psychiatria Danubina* **2018**, 30 (3).
15. B, P.; A, S.; C, B., Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* **2019**, 126 (11).
16. I, K.; MA, T.; H, H.; MS, A.; A, K.; F, H.; A, D., Synthesis of pyrimidin-4-one-1,2,3-triazole conjugates as glycogen synthase kinase-3 β inhibitors with antidepressant activity. *Bioorganic chemistry* **2016**, 68.
17. Singh, K.; Pal, R.; Khan, S.; Kumar, B.; Akhtar, J., Insights into the structure activity relationship of nitrogen-containing heterocyclics for the development of antidepressant compounds: An updated review. *Journal of Molecular Structure* **2021**, 1237.
18. G, G.; R, N.; R, B.; MJ, A., Synthetic and therapeutic perspectives of nitrogen containing heterocycles as anti-convulsants. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2020**, 28 (15).
19. Costa, G. P.; Dias, Í. F. C.; Fronza, M. G.; Besckow, E. M.; Fetter, J.; Nascimento, J. E. R.; Jacob, R. G.; Savegnago, L.; Bortolatto, C. F.; Brüning, C. A.; Alves, D., Synthesis of 2'-(1,2,3-triazoyl)-acetophenones: molecular docking and inhibition of in vitro monoamine oxidase activity. **2020**.

20. Becker, M.; Pinhasov, A.; Ornoy, A., Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? *Diagnostics* **2021**, *11* (1), 123.
21. Harro, J., Animal models of depression: pros and cons. *Cell and Tissue Research* **2018**, *377* (1), 5-20.
22. Y, H.; H, G.; M, S.; Y, G., Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20* (19).
23. Q, W.; MA, T.; K, P.; Y, D., The recent progress in animal models of depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2017**, *77*.
24. EM, B.; NT, N.; CS, G.; CN, d. S. E.; ÉB, B.; F, G.; L, S.; B, G.; CF, B.; CA, B., Antidepressant-like effect of a selenopropargylic benzamide in mice: involvement of the serotonergic system. *Psychopharmacology* **2020**, *237* (10).
25. CS, G.; EM, B.; CN, d. S. E.; G, D. A. N.; NP, Z.; MP, d. A.; MJD, R.; LR, C. J.; F, P.; CS, G.; EJ, L.; CF, B.; CA, B., Antidepressant-Like Effect of a Selenoindolizine in Mice: In Vivo and In Silico Evidence for the Involvement of the Serotonergic 5-HT_{2A/C} Receptors. *ACS chemical neuroscience* **2022**, *13* (12).
26. T, d. S. T. R.; A, G. A.; D, N. S.; L, D. K.; LR, C. J.; JS, D. S. N.; AL, B.; CA, B.; C, F. B., 2-Phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran elicits acute antidepressant-like action in male Swiss mice mediated by modulation of the dopaminergic system and reveals therapeutic efficacy in both sexes. *Psychopharmacology* **2021**, *238* (10).
27. X, L.; C, Q.; J, Z.; M, S.; L, J.; J, S., The Antidepressant Effect of Deoiled Sunflower Seeds on Chronic Unpredictable Mild Stress in Mice Through Regulation of Microbiota-Gut-Brain Axis. *Frontiers in nutrition* **2022**, *9*.
28. JI, G.; A, G. A.; LR, C. J.; T, d. S. T. R.; JS, D. S. N.; D, A.; MS, P. S.; L, S.; RM, S.; CA, B.; C, F. B., Insights into serotonergic and antioxidant mechanisms involved in antidepressant-like action of 2-phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2020**, *102*.
29. L, M.; M, C.; G, D. A.; F, T., Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain research bulletin* **2018**, *143*.
30. JP, R.; M, B.; MC, C.; GB, B., Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* **1998**, *138* (1).
31. CH, P.; CY, X.; Y, Y.; Y, H.; R, S.; J, H.; ZX, W.; YM, W.; WK, Z.; JK, X., Loganin ameliorates depression-like behaviors of mice via modulation of serotonergic system. *Psychopharmacology* **2021**, *238* (11).
32. ÖD, C.; N, T.; Ü, D. Ö.; Y, Ö., Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. *Life sciences* **2017**, *190*.
33. PM, G.; DR, d. O.; IF, F.; JO, F.; MC, V.; SS, d. M.; FF, d. R.; TC, d. L.; EA, C.; R, M., Involvement of the monoamine system in antidepressant-like properties of 4-(1-phenyl-1h-pyrazol-4-ylmethyl)-piperazine-1-carboxylic acid ethyl ester. *Life sciences* **2015**, *143*.
34. O'Leary, O. F.; Bechtholt, A. J.; Crowley, J. J.; Hill, T. E.; Page, M. E.; Lucki, I., Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology* **2007**, *192* (3), 357-371.
35. RF, S.; F, d. L. O.; RG, D. S.; LR, M.; JP, M.-d.-O.; L, W.-A.; DB, d. A.; J, R.; JA, C.; JE, H., Antidepressant Effects of a Single Dose of Ayahuasca in Patients With Recurrent Depression: A SPECT Study. *Journal of clinical psychopharmacology* **2016**, *36* (1).

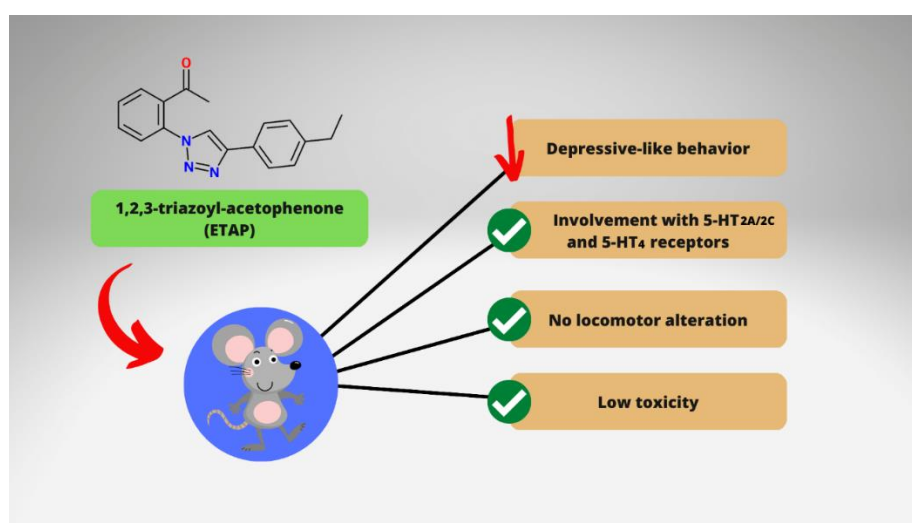
36. RR, G.; MW, J.; MA, C.; A, U.; WA, R.; BD, R.; MP, C.; MA, K., Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: A randomized double-blind trial. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **2016**, 30 (12).
37. RL, C.-H.; M, B.; CMJ, D.; J, R.; R, W.; DE, E.; M, K.; B, G.; M, B.; S, P.; JA, R.; B, F.; A, F.; D, T.; HV, C.; DJ, N., Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: six-month follow-up. *Psychopharmacology* **2018**, 235 (2).
38. M, H.; AN, L.; HM, K.; ZK, T.; CD, N., Psychedelics, but Not Ketamine, Produce Persistent Antidepressant-like Effects in a Rodent Experimental System for the Study of Depression. *ACS chemical neuroscience* **2020**, 11 (6).
39. AL, P.; D, R.; A, K.; R, M., The role of serotonin neurotransmission in rapid antidepressant actions. *Psychopharmacology* **2022**, 239 (6).
40. G, Q.; AC, P.; HT, N.; L, D.; R, C.; S, R.; I, S.; P, R.; D, D.; JP, G.; AM, G.; C, V.; L, B.; E, C.; BP, G., Genetic dysfunction of serotonin 2A receptor hampers response to antidepressant drugs: A translational approach. *Neuropharmacology* **2016**, 105.
41. A, D.; C, M. I. C.; A, G.; M, B.; F, L.; F, S.; T, S.; A, D.; A, S.; M, P.; JM, R.; G, F.; TI, C.; O, M.; G, L.; MJ, M., S32006, a novel 5-HT_{2C} receptor antagonist displaying broad-based antidepressant and anxiolytic properties in rodent models. *Psychopharmacology* **2008**, 199 (4).
42. S, R.-L.; A, S.; G, S.; P, M.; I, L.; JE, M.; S, G.; J, B.; JF, C.; SJ, S. R.; J, D.; JE, B.; KL, M., Antidepressant-like effects of the novel, selective, 5-HT_{2C} receptor agonist WAY-163909 in rodents. *Psychopharmacology* **2007**, 192 (2).
43. MD, O.; SC, K.; M, M.; J, B.; J, W.; D, D.; LJ, K.; N, S.; SM, D., Serotonin 2C receptor antagonists induce fast-onset antidepressant effects. *Molecular psychiatry* **2014**, 19 (10).
44. A, C.; F, T.; M, S.; C, T.; M, B., 5-HT_{2C} receptors in psychiatric disorders: A review. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2016**, 66.
45. M, H.; P, B., Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2013**, 45.
46. I, M.-D.; DJ, D.; F, D.; MV, W.; S, K.-R.; AM, G.; R, H., Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **2014**, 39 (6).
47. BA, S.; I, M.-D.; C, F.; SA, D.; KA, P.; AM, G.; R, H.; DJ, D., Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **2016**, 22 (1).
48. DJ, D.; AM, G., [The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response]. *L'Encephale* **2016**, 42 (3).
49. G, L.; J, D.; T, R.; O, M.-F.; N, H.; G, P.; G, D., Selective serotonin reuptake inhibitors potentiate the rapid antidepressant-like effects of serotonin₄ receptor agonists in the rat. *PloS one* **2010**, 5 (2).
50. J, P.-B.; E, C.; A, D.; EM, V.; F, P.-C.; R, V.; B, T.; A, P., Modulation of neuroplasticity pathways and antidepressant-like behavioural responses following the short-term (3 and 7 days) administration of the 5-HT₄ receptor agonist RS67333. *The international journal of neuropsychopharmacology* **2012**, 15 (5).
51. G, L.; VV, R.; J, D.; O, M.-F.; C, B.; S, M.; L, L.-S.; O, W.; N, H.; G, P.; AF, S.; G, D., Serotonin₄ (5-HT₄) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron* **2007**, 55 (5).

52. A, T.; V, M.; A, N.; F, D., Antidepressant properties of the 5-HT₄ receptor partial agonist, SL65.0155: behavioral and neurochemical studies in rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2009**, 33 (7).
53. N, K.; A, O.; T, S., Roles of the serotonin 5-HT₄ receptor in dendrite formation of the rat hippocampal neurons in vitro. *Brain research* **2017**, 1655.
54. Y, S.; M, B.; O, K.; V, C.; D, A.-G.; K, B.; MH, S.; M, M.; V, C.; S, B.; K, B.; J, W.; L, B.; N, C.; A, D.; A, Z.; DA, R.; E, P., Serotonin 5-HT₄ receptor boosts functional maturation of dendritic spines via RhoA-dependent control of F-actin. *Communications biology* **2020**, 3 (1).
55. S, C.; M, B.; J, M.-P.; JF, C.-L., Major depression and heart failure: Interest of monoamine oxidase inhibitors. *International journal of cardiology* **2017**, 247.
56. R, S.; V, T.; R, G.; T, B.; C, d. D.; J, A.; O, P.; JC, S.; PJ, C.; S, S., Revisiting monoamine oxidase inhibitors for the treatment of depressive disorders: A systematic review and network meta-analysis. *Journal of affective disorders* **2021**, 282.
57. Chand, S. P.; Arif, H.; Kutlenios, R. M., Depression (nursing). **2021**.
58. Development, O. f. E. C.-o. a., OECD guideline for testing of Chemical. In: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method Test No. 423. 2001; pp 1-14.
59. RD, P.; A, B.; M, J., Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* **1977**, 229 (2).
60. L, S.; R, C.; B, T.; P, S., The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* **1985**, 85 (3).
61. RN, W.; RA, C., The Open-Field Test: a critical review. *Psychological bulletin* **1976**, 83 (3).

For Table of Contents Only

Antidepressant-like effect of 1-(2-(4-(4-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)ethan-1-one in mice: evidence of the contribution of the serotonergic system

Marcelo Heinemann Presa¹, Marcia Juciele da Rocha¹, Camila Simões Pires¹, Kauane Nayara Bahr Ledebuhr¹, Gabriel Pereira da Costa², Diego Alves², Cristiani Folharini Bortolatto^{1*}, César Augusto Brüning^{1*}



5. Discussão

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a ETAP apresentou efeito do tipo antidepressivo sem alterar as atividades locomotora e exploratória dos animais testados. Nossos dados ainda sugerem que o efeito apresentado é dependente do sistema serotoninérgico na sua integridade e está relacionado a modulação dos receptores 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₄. Ademais, a ETAP não apresentou sinais de toxicidade.

A utilização de testes comportamentais para avaliação de comportamento depressivo via desespero é rotineira em avaliações de efeitos antidepressivos de novos fármacos em análises pré-clínicas, tendo como testes mais utilizados para esta triagem os TNF e TSC, conforme já mencionado (BECKER; PINHASOV; ORNOY, 2021). Os testes para avaliação de comportamento depressivo via desespero visam avaliar parâmetros relacionados a mobilidade do animal, avaliando a latência para o primeiro episódio de imobilidade e a imobilidade total. Um aumento no tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade, combinado a uma redução no tempo total de imobilidade em análises pré-clínicas conferem ao fármaco avaliado um efeito do tipo antidepressivo (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019; WANG et al., 2017).

Como pode ser observado nos resultados obtidos no TNF, as doses de 1 e 5 mg/kg reduziram o tempo de imobilidade total quando comparados ao grupo controle. Entretanto, apenas na dose de 1 mg/kg foi possível observar uma alteração significativa na latência para o primeiro episódio de imobilidade. Estas alterações observadas na dose de 1 mg/kg conferem a ETAP um efeito do tipo antidepressivo, conforme descrito por Wang e colaboradores (2017). Quando avaliados os resultados obtidos na execução do TSC, as doses de 1 e 5 mg/kg apresentaram alterações em ambas os parâmetros avaliados, estando de acordo e reforçando o efeito do tipo antidepressivo encontrado no TNF.

Esta maior sensibilidade apresentada pela ETAP ao expor os animais ao TSC observada em nossos resultados pode ser justificada pelos dados descritos por Singh e colaboradores (2021), o qual relata que compostos contendo grupos triazóis apresentam efeito antidepressivo semelhantes aos ISRS's. Evidências apontam que o TSC é um teste com maior sensibilidade para esta classe de

fármacos (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Nossos achados corroboram com as afirmativas de que triazóis apresentam efeitos antidepressivos semelhantes aos ISRS's levando em consideração uma maior sensibilidade destes fármacos para o TSC. Com base nisto, o efeito do tipo antidepressivo da ETAP pode estar relacionado a uma maior disponibilidade de 5-HT no meio extracelular, uma vez que pode estar inibindo o SERT, transportador deste neurotransmissor.

Além do efeito antidepressivo semelhante aos ISRS's, Singh e colaboradores (2021) sugerem que os triazóis também apresentam relação com os IMAO's. Os dados referentes a ETAP obtidos por Costa e colaboradores (2021) demonstram que, de fato, a ETAP demonstrou atividade de inibição da MAO em análises *in vitro*, predita por análise *in silico* de docagem molecular. Estas informações sugerem que a ação do tipo antidepressiva desta molécula pode ser, também, por inibição da MAO, resultando em um aumento de biodisponibilidade de monoaminas no meio extracelular e intracelular, sinalizando uma vantagem do uso desta classe de fármaco quando comparada as demais (VAN DEN EYNDE et al., 2022). A descoberta de antidepressivos com mecanismos de ação mais seletivos diminuiu a prescrição de IMAO'S, que, antigamente, eram não-seletivos para as diferentes isoformas da MAO. Entretanto, os resultados obtidos por Costa e colaboradores (2021) mostraram uma inibição da MAO dependente de concentração, apresentando valor de IC₅₀ muito menor para a isoforma A, indicando uma preferência para inibição desta isoforma.

Em nossa pesquisa, a fluoxetina foi utilizada como controle positivo por se tratar de um fármaco com efeito já conhecido e aprovado para comércio e prescrição, apenas para garantir a eficácia do protocolo experimental utilizado (MICHELI et al., 2018). A utilização da fluoxetina para esta finalidade pode ser observada em diversas pesquisas (BESCKOW et al., 2020; DA ROCHA et al., 2023; GALL et al., 2020; GARCIA et al., 2022). Nossos dados demonstram que a fluoxetina reduziu ambos os parâmetros em ambos os testes avaliados, estando de acordo com a validade preditiva, validando o protocolo utilizado.

Algumas drogas com atividade psicoestimulante podem apresentar falso positivo nos testes comportamentais para depressão (ABREU et al., 2018). Por

esta razão, para descartar a possibilidade de o efeito anti-imobilidade apresentado pela ETAP estar relacionado a um aumento na atividade locomotora, o TCA foi executado anteriormente a cada teste comportamental. Não foram observadas alterações nas atividades locomotora e exploratória dos animais, descartando qualquer déficit ou aumento na locomoção uma vez que não houve alterações nos parâmetros *crossing* e *rearing* em nenhum grupo avaliado. Estes dados indicam que o efeito apresentado pela ETAP não se relaciona a efeitos psicoestimulante, confirmando que as alterações dos parâmetros observadas no TNF e TSC estão relacionadas ao efeito do tipo antidepressivo desta molécula.

Ainda, nossa pesquisa avaliou a contribuição do sistema serotoninérgico para o efeito do tipo antidepressivo da ETAP a partir do pré-tratamento de um depletor de serotonina e de antagonistas específicos dos receptores serotoninérgicos 5-HT₁, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ e 5-HT₄. Para esta etapa da análise, selecionamos a dose de 1 mg/kg por se tratar da menor dose efetiva e o TSC por ter apresentado maior sensibilidade ao tratamento com ETAP.

O *p*-CPA é um inibidor da TPH – enzima responsável pela conversão de triptofano em 5-HT, conforme já mencionado – gerando uma redução de aproximadamente 60% dos níveis de 5-HT cerebral em camundongos (REDROBE et al., 1998). Diversas pesquisas dispostas na literatura utilizam este inibidor para avaliar se candidatos a novos fármacos antidepressivos em fase de testes pré-clínicos necessitam da integridade do sistema serotoninérgico para exercer suas ações (CAN et al., 2017; GALDINO et al., 2015; PAN et al., 2021). Entretanto, para que a redução dos níveis serotoninérgicos não resulte em sintomas depressivos e interferentes na análise, deve-se atentar a dose utilizada (O'LEARY et al., 2007). Baseando-nos em pesquisas prévias realizadas em nosso laboratório de pesquisa (DA ROCHA et al., 2023; GALL et al., 2020), utilizamos *p*-CPA na dose de 100 mg/kg devido a capacidade desta dose de reduzir os níveis de serotonina sem causar sintomas depressivos mensuráveis pelos parâmetros avaliados. Nossos achados demonstraram que o efeito da ETAP é dependente da presença de serotonina uma vez que o pré-tratamento com *p*-CPA impediu o efeito anti-imobilidade apresentado por esta molécula, demonstrado pela inalteração estatística do tempo de latência para o primeiro

episódio de imobilidade, bem como a imobilidade total do grupo interação *p*-CPA – ETAP quando comparados ao grupo controle. Ademais, o grupo de animais tratados apenas com *p*-CPA também não apresentou alteração estatística quando comparado ao grupo controle, comprovando que a dose utilizada não gerou comportamento depressivo.

Para a avaliação do envolvimento dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₃ no efeito do tipo antidepressivo da ETAP, foram utilizados os antagonistas específicos destes receptores WAY100635 e Ondansetrona, respectivamente. Não observamos alterações no efeito anti-imobilidade da ETAP em nenhum parâmetro avaliado para comportamento depressivo na interação com estes antagonistas, indicando que a ação do tipo antidepressiva desta molécula não está relacionada a modulação dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₃.

Na avaliação do envolvimento dos receptores 5-HT_{2A/2C} utilizamos o antagonista Cetanserina. O bloqueio destes receptores impediu a ETAP de gerar seu efeito tipo antidepressivo, observado pela alteração dos parâmetros previamente avaliados, como redução do tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e aumento no tempo total de imobilidade do grupo interação Cetanserina – ETAP quando comparado ao grupo tratado apenas com ETAP. Os receptores 5-HT_{2A/2C} estão amplamente distribuídos pelo SNC e são considerados de extrema importância no tratamento de transtornos de humor, sendo constantemente estudados como alvos terapêuticos por estarem envolvidos na modulação de diversos processos cognitivos pela interação com outros receptores (BARROTO-ESCUELA et al., 2021). Há evidências de que agonistas dos receptores 5-HT_{2A} apresentam efeito antidepressivo de ação rápida em estudos clínicos e pré-clínicos, e que esta rápida ação pode estar relacionada a um aumento da plasticidade sináptica em neurônios corticais por consequente aumento da expressão de BDNF gerado pela ativação deste receptor (CARHART-HARRIS et al., 2018; HIBICKE et al., 2020; PEHRSON et al., 2022; SANCHES et al., 2016).

Em relação ao receptor 5-HT₄, utilizamos o antagonista GR113808 para avaliar se a ação do tipo antidepressiva da ETAP estava envolvida na sua modulação. De fato, o antagonismo deste receptor bloqueou o efeito previamente observado pelo tratamento com ETAP, impedindo seu efeito anti-

imobilidade. Mendez-David e colaboradores (2014) demonstraram que a ativação dos receptores 5-HT₄ apresenta atividade antidepressiva, enquanto o bloqueio dificulta a ação dos ISRS's. Considerando a inibição da recaptação de 5-HT um provável mecanismo para a ação antidepressiva da ETAP, os dados mencionados por Mendez-David e colaboradores corroboram com nossos achados e com os dados mencionados por Singh e colaboradores (2021), de que os compostos contendo triazóis apresentam efeito antidepressivo semelhante aos ISRS's. Além disto, pesquisas sugerem que agonistas dos receptores 5-HT₄ apresentam efeito do tipo antidepressivo em análises pré-clínicas por reduzirem o tempo de imobilidade nos TSC e TNF, e aumentar a preferência pela sacarose no Teste de Preferência a Sacarose (LUCAS et al., 2010; 2007). Além de evidências comportamentais, evidências biológicas também sugerem um efeito antidepressivo para agonistas deste receptor, como aumento da neuroplasticidade e neurogênese com consequente aumento da complexidade da arborização dendrítica e maturação dos espinhos dendríticos hipocampais (KOZONO; OHTANI; SHIGA, 2017; MENDEZ-DAVID et al., 2014; SCHILL et al., 2020; TAMBURELLA et al., 2009).

Ainda, avaliamos a toxicidade da ETAP na dose de 50 mg/kg em camundongos fêmeas, conforme recomendado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. Em suma, a ETAP não apresentou sinais gerais de toxicidade e, após eutanásia dos animais, os tecidos foram encontrados visualmente inalterados. Curiosamente, as análises bioquímicas demonstraram uma redução nos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase quando comparado ao grupo controle, sendo necessário novos estudos para analisar este efeito.

Ademais, os tratamentos avaliados durante esta pesquisa não resultaram em alterações exploratórias e locomotoras em nenhum grupo avaliado, reforçando o efeito anti-imobilidade da ETAP como resultado de uma ação do tipo antidepressiva.

6. Conclusão

Os dados apresentados nesta dissertação são a primeira evidência de uma ação do tipo antidepressiva gerada pelo tratamento de ETAP em camundongos. Nossos achados sugerem que a ETAP apresenta efeito do tipo antidepressivo, em baixas doses, dependente do sistema de serotonina pela modulação dos receptores 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₄. O efeito de anti-imobilidade apresentado não foi decorrente de uma ação psicoestimulante, uma vez que não apresentou alteração nas atividades locomotora e exploratória. Ainda, a ETAP apresentou baixo potencial de efeitos adversos por toxicidade.

7. Perspectivas

Como perspectiva, pretendemos:

- avaliar o efeito do tipo antidepressivo apresentado pela ETAP em camundongos fêmeas;
- avaliar a contribuição de outros sistemas neurais na ação tipo antidepressiva da ETAP;
- expandir a avaliação da atividade antidepressiva para modelos de indução de depressão por diferentes vias;
- expandir a avaliação do efeito da ETAP para outros transtornos psiquiátricos.

8. Referências Bibliográficas

ABREU, T. M.; MONTEIRO, V. S.; MARTINS, A. B. S.; TELES, F. B. *et al.* Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International journal of biological macromolecules**, 111, p. 534-541, 2018.

ADKI, K. M.; KULKARNI, Y. A. Chemistry, pharmacokinetics, pharmacology and recent novel drug delivery systems of paeonol. **Life sciences**, 250, p. 117544, 2020.

AL-BLEWI, F. F.; ALMEHMADI, M. A.; AOUAD, M. R.; BARDAWEEL, S. K. *et al.* Design, synthesis, ADME prediction and pharmacological evaluation of novel benzimidazole-1, 2, 3-triazole-sulfonamide hybrids as antimicrobial and antiproliferative agents. **Chemistry Central Journal**, 12, n. 1, p. 1-14, 2018.

ALEKSANDROVA, L. R.; WANG, Y. T.; PHILLIPS, A. G. Evaluation of the Wistar-Kyoto rat model of depression and the role of synaptic plasticity in depression and antidepressant response. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 105, p. 1-23, 2019.

AOUAD, M. R.; SOLIMAN, M. A.; ALHARBI, M. O.; BARDAWEEL, S. K. *et al.* Design, synthesis and anticancer screening of novel benzothiazole-piperazine-1, 2, 3-triazole hybrids. **Molecules**, 23, n. 11, p. 2788, 2018.

ARAÚJO, A. N. V. D. Investigação da atividade antidepressiva do orto-Eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona. Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa: 84 p. 2018.

ASSOCIATION, A. P. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fifth Edition – Text Revision. 2022.

ATZORI, M.; CUEVAS-OLGUIN, R.; ESQUIVEL-RENDON, E.; GARCIA-OSCOS, F. *et al.* Locus ceruleus norepinephrine release: a central regulator of CNS spatio-temporal activation? **Frontiers in synaptic neuroscience**, 8, p. 25, 2016.

BAGHAI, T. C.; VOLZ, H.-P.; MÖLLER, H.-J. Drug treatment of depression in the 2000s: An overview of achievements in the last 10 years and future possibilities. **The World Journal of Biological Psychiatry**, 7, n. 4, p. 198-222, 2006.

BAHR, R.; LOPEZ, A.; REY, J. A. Intranasal esketamine (Spravato™) for use in treatment-resistant depression in conjunction with an oral antidepressant. **Pharmacy and Therapeutics**, 44, n. 6, p. 340, 2019.

BASTOS, S. Neuroquímica da depressão: uma revisão integrativa. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)–Faculdade Nova Esperança de Mossoró**, 2020.

BECKER, M.; PINHASOV, A.; ORNOY, A. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? **Diagnostics**, 11, n. 1, p. 123, 2021-01-14 2021. Review.

BELZUNG, C.; WILLNER, P.; PHILIPPOT, P. Depression: from psychopathology to pathophysiology. **Current opinion in neurobiology**, 30, p. 24-30, 2015.

BESCKOW, E. M.; NONEMACHER, N. T.; GARCIA, C. S.; DA SILVA ESPÍNDOLA, C. N. *et al.* Antidepressant-like effect of a selenopropargylic benzamide in mice: involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology**, 237, p. 3149-3159, 2020.

BHATT, S.; NAGAPPA, A. N.; PATIL, C. R. Role of oxidative stress in depression. **Drug discovery today**, 25, n. 7, p. 1270-1276, 2020.

BORROTO-ESCUELA, D. O.; AMBROGINI, P.; CHRUŚCICKA, B.; LINDSKOG, M. *et al.* The role of central serotonin neurons and 5-HT heteroreceptor complexes in the pathophysiology of depression: a historical perspective and future prospects. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 4, p. 1927, 2021.

BORTOLATO, M.; SHIH, J. C. Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. **International review of neurobiology**, 100, p. 13-42, 2011.

BORTOLUZZI, A. Estudo de associação entre o transtorno de ansiedade e seus endofenótipos e o polimorfismo na região promotora do gene do transportador de serotonina (5-HTTLPR) em adolescentes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências: 102 p. 2012.

BOURIN, M. Chagraoui A (2016) Prerequisites for Phase I and II Clinical Drug Trials in Human. **SOJ Pharm Pharm Sci**, 3, n. 1, p. 1-3, 2016.

BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1, 2, 3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 27, n. 16, p. 3511-3531, 2019.

BRIGITTA, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

CAN, Ö. D.; TURAN, N.; ÖZKAY, Ü. D.; ÖZTÜRK, Y. Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. **Life sciences**, 190, p. 110-117, 2017.

CARHART-HARRIS, R. L.; BOLSTRIDGE, M.; DAY, C. M.; RUCKER, J. *et al.* Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: six-month follow-up. **Psychopharmacology**, 235, p. 399-408, 2018.

CARHART-HARRIS, R. L.; NUTT, D. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. **Journal of Psychopharmacology**, 31, n. 9, p. 1091-1120, 2017.

CHAND, S. P.; ARIF, H.; KUTLENIOS, R. M. Depression (nursing). 2021.

COATRIEUX, C.; SANSON, M.; NEGRE-SALVAYRE, A.; PARINI, A. *et al.* MAO-A-induced mitogenic signaling is mediated by reactive oxygen species, MMP-2, and the sphingolipid pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, 43, n. 1, p. 80-89, 2007.

COHEN, Z. D.; DERUBEIS, R. J. Treatment selection in depression. **Annual Review of Clinical Psychology**, 14, p. 209-236, 2018.

COPPEN, A.; SHAW, D.; HERZBERG, B.; MAGGS, R. Tryptophan in the treatment of depression. **The Lancet**, 290, n. 7527, p. 1178-1180, 1967.

CORRIGER, A.; PICKERING, G. Ketamine and depression: a narrative review. **Drug design, development and therapy**, p. 3051-3067, 2019.

COSTA, G. P.; DIAS, Í. F.; FRONZA, M. G.; BESCKOW, E. M. *et al.* Synthesis of 2'-(1, 2, 3-triazoyl)-acetophenones: molecular docking and inhibition of in vitro monoamine oxidase activity. **New Journal of Chemistry**, 45, n. 2, p. 714-724, 2021.

COWEN, P. J.; BROWNING, M. What has serotonin to do with depression? **World Psychiatry**, 14, n. 2, p. 158, 2015.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

DA CRUZ, A. F. P.; MELHO, V.; DE SOUZA, B.; SILVA, G. *et al.* Fármacos antidepressivos: prevalência, perfil e conhecimento da população usuária. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, 2, n. 2, p. 27-34, 2020.

DA ROCHA, M. J.; PIRES, C. S.; PRESA, M. H.; BESCKOW, E. M. *et al.* Involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of 1-(phenylselanyl)-2-(p-tolyl) indolizine in mice. **Psychopharmacology**, p. 1-17, 2023.

DAVID, D.; GARDIER, A. The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response. **L'encephale**, 42, n. 3, p. 255-263, 2016.

DEAN, J.; KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian journal of psychiatry**, 27, p. 101-111, 2017.

DESWAL, L.; VERMA, V.; KIRAR, J. S.; KUMAR, D. *et al.* Benzimidazole-1,2,3-triazole-piperazine hybrids: design, synthesis, antidiabetic evaluation and molecular modelling studies. **Research on Chemical Intermediates**, p. 1-25, 2022-12-19 2022. OriginalPaper.

DONATO, F.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; SEUS, N. *et al.* Involvement of the dopaminergic and serotonergic systems in the antidepressant-like effect caused by 4-phenyl-1-(phenylselanylmethyl)-1, 2, 3-triazole. **Life sciences**, 93, n. 9-11, p. 393-400, 2013.

DRAPIER, D.; BENTUÉ-FERRER, D.; LAVIOLLE, B.; MILLET, B. *et al.* Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, 176, n. 2, p. 202-209, 2007.

EL MANSARI, M.; GUIARD, B. P.; CHERNOLOZ, O.; GHANBARI, R. *et al.* Relevance of norepinephrine–dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder. **CNS neuroscience & therapeutics**, 16, n. 3, p. e1-e17, 2010.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 28, n. 3, p. 435-451, 2004.

EZE, I. C.; FORASTER, M.; SCHAFFNER, E.; VIENNEAU, D. *et al.* Incidence of depression in relation to transportation noise exposure and noise annoyance in the SAPALDIA study. **Environment international**, 144, p. 106014, 2020.

FALLAH, Z.; TAJBAKHSH, M.; ALIKHANI, M.; LARIJANI, B. *et al.* A review on synthesis, mechanism of action, and structure-activity relationships of 1, 2, 3-triazole-based α -glucosidase inhibitors as promising anti-diabetic agents. **Journal of Molecular Structure**, p. 132469, 2022.

FERRARI, F.; VILLA, R. The neurobiology of depression: an integrated overview from biological theories to clinical evidence. **Molecular neurobiology**, 54, n. 7, p. 4847-4865, 2017.

FERREIRA, M. F.; CASTANHEIRA, L.; SEBASTIÃO, A. M.; TELLES-CORREIA, D. Depression assessment in clinical trials and pre-clinical tests: a critical review. **Current topics in medicinal chemistry**, 18, n. 19, p. 1677-1703, 2018.

FF, A.-B.; MA, A.; MR, A.; SK, B. *et al.* Design, synthesis, ADME prediction and pharmacological evaluation of novel benzimidazole-1,2,3-triazole-sulfonamide hybrids as antimicrobial and antiproliferative agents. **Chemistry Central journal**, 12, n. 1, 11/01/2018 2018.

FRONZA, M. G.; BALDINOTTI, R.; FETTER, J.; ROSA, S. G. *et al.* Beneficial effects of QTC-4-MeOBnE in an LPS-induced mouse model of depression and cognitive impairments: the role of blood-brain barrier permeability, NF- κ B signaling, and microglial activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, 99, p. 177-191, 2022.

FRONZA, M. G.; SACRAMENTO, M.; ALVES, D.; PRATICÒ, D. *et al.* QTC-4-MeOBnE Ameliorated Depressive-Like Behavior and Memory Impairment in 3xTg Mice. **Molecular Neurobiology**, p. 1-13, 2022.

G, S.; M, K.; J, T. 5-HT Receptors and the Development of New Antidepressants. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 16, 08/20/2021 2021.

GALDINO, P. M.; DE OLIVEIRA, D. R.; FLORENTINO, I. F.; FAJEMIROYE, J. O. *et al.* Involvement of the monoamine system in antidepressant-like properties of 4-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethyl)-piperazine-1-carboxylic acid ethyl ester. **Life sciences**, 143, p. 187-193, 2015.

GALL, J. I.; ALVES, A. G.; JÚNIOR, L. R. C.; RECH, T. D. S. T. *et al.* Insights into serotonergic and antioxidant mechanisms involved in antidepressant-like action of 2-phenyl-3-(phenylselanyl) benzofuran in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 102, p. 109956, 2020.

GARCIA, C. S.; BESCKOW, E. M.; DA SILVA ESPÍNDOLA, C. N.; D'AVILA NUNES, G. *et al.* Antidepressant-like effect of a selenoindolizine in mice: in vivo and in silico evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{2A/C} receptors. **ACS Chemical Neuroscience**, 13, n. 12, p. 1746-1755, 2022.

GENG, Z.-H.; ZHU, Y.; LI, Q.-L.; ZHAO, C. *et al.* Enteric nervous system: The bridge between the gut microbiota and neurological disorders. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 14, 2022.

GOULD, T. D.; ZARATE JR, C. A.; THOMPSON, S. M. Molecular pharmacology and neurobiology of rapid-acting antidepressants. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 59, p. 213-236, 2019.

GRACE, A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nature Reviews Neuroscience**, 17, n. 8, p. 524-532, 2016.

GRUNDMANN, M.; KACIROVA, I.; URINOVSKA, R. Therapeutic monitoring of psychoactive drugs-antidepressants: a review. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc**, 159, n. 1, 2015.

GRUNST, A. S.; GRUNST, M. L.; STAES, N.; THYS, B. *et al.* Serotonin transporter (SERT) polymorphisms, personality and problem-solving in urban great tits. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 24270, 2021.

GUIARD, B. P.; EL MANSARI, M.; BLIER, P. Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. **Molecular pharmacology**, 74, n. 5, p. 1463-1475, 2008.

GUIARD, B. P.; EL MANSARI, M.; MERALI, Z.; BLIER, P. Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 11, n. 5, p. 625-639, 2008.

HAASE, J.; BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression—a central role for the serotonin transporter? **Pharmacology & therapeutics**, 147, p. 1-11, 2015.

HAO, Y.; GE, H.; SUN, M.; GAO, Y. Selecting an appropriate animal model of depression. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 19, p. 4827, 2019.

HARRO, J. Animal models of depression: pros and cons. **Cell and tissue research**, 377, n. 1, p. 5-20, 2019.

HENTER, I. D.; DE SOUSA, R. T.; ZARATE JR, C. A. Glutamatergic modulators in depression. **Harvard review of psychiatry**, 26, n. 6, p. 307, 2018.

HENTER, I. D.; PARK, L. T.; ZARATE JR, C. A. Novel glutamatergic modulators for the treatment of mood disorders: current status. **CNS drugs**, 35, n. 5, p. 527-543, 2021.

HIBICKE, M.; LANDRY, A. N.; KRAMER, H. M.; TALMAN, Z. K. *et al.* Psychedelics, but not ketamine, produce persistent antidepressant-like effects in a rodent experimental system for the study of depression. **ACS chemical neuroscience**, 11, n. 6, p. 864-871, 2020.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental and clinical psychopharmacology**, 23, n. 1, p. 1, 2015.

HUANG, K. W.; OCHANDARENA, N. E.; PHILSON, A. C.; HYUN, M. *et al.* Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. **Elife**, 8, p. e46464, 2019.

IHMAID, S. K.; ALRAQA, S. Y.; AOUAD, M. R.; ALJUHANI, A. *et al.* Design of molecular hybrids of phthalimide-triazole agents with potent selective MCF-7/HepG2 cytotoxicity: Synthesis, EGFR inhibitory effect, and metabolic stability. **Bioorganic Chemistry**, 111, p. 104835, 2021.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model-are we there yet? **Behavioural brain research**, 341, p. 79-90, 2018.

KOLAR, D.; KLETECKOVA, L.; BROZKA, H.; VALES, K. Mini-review: brain energy metabolism and its role in animal models of depression, bipolar disorder, schizophrenia and autism. **Neuroscience letters**, 760, p. 136003, 2021.

KORE, R.; SRIVASTAVA, R.; SATPATI, B. Synthesis of industrially important aromatic and heterocyclic ketones using hierarchical ZSM-5 and beta zeolites. *Elsevier*. 493: 129-141 p. 2015.

KOZONO, N.; OHTANI, A.; SHIGA, T. Roles of the serotonin 5-HT₄ receptor in dendrite formation of the rat hippocampal neurons in vitro. **Brain research**, 1655, p. 114-121, 2017.

KREUTZER, F. P.; MEINECKE, A.; SCHMIDT, K.; FIEDLER, J. *et al.* Alternative strategies in cardiac preclinical research and new clinical trial formats. **Cardiovascular research**, 118, n. 3, p. 746-762, 2022.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, 9, p. 6, 2018.

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

LI, Z.; RUAN, M.; CHEN, J.; FANG, Y. Major depressive disorder: advances in neuroscience research and translational applications. **Neuroscience bulletin**, 37, p. 863-880, 2021.

LINNÉR, L.; ENDERSZ, H.; ÖHMAN, D.; BENGTSSON, F. *et al.* Reboxetine modulates the firing pattern of dopamine cells in the ventral tegmental area and selectively increases dopamine availability in the prefrontal cortex. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 297, n. 2, p. 540-546, 2001.

LUCAS, G.; DU, J.; ROMEAS, T.; MNIE-FILALI, O. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors potentiate the rapid antidepressant-like effects of serotonin₄ receptor agonists in the rat. **PloS one**, 5, n. 2, p. e9253, 2010.

LUCAS, G.; RYMAR, V. V.; DU, J.; MNIE-FILALI, O. *et al.* Serotonin₄ (5-HT₄) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. **Neuron**, 55, n. 5, p. 712-725, 2007.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current pharmaceutical design**, 15, n. 14, p. 1563-1586, 2009.

M, P.; FG, M.; M, A.; E, S. *et al.* The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. **Cellular and molecular neurobiology**, 42, n. 6, 2022 Aug 2022.

M, P.; V, V.; V, M.; M, F. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. **Physiological research**, 60, n. 1, 2011 2011.

MALETIC, V.; ERAMO, A.; GWIN, K.; OFFORD, S. J. *et al.* The role of norepinephrine and its α -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: a systematic review. **Frontiers in psychiatry**, 8, p. 42, 2017.

MALHI, G.; MANN, J. Depression. *Lancet Lond. Engl.* 2018.

MARGOLIS, K. G. A role for the serotonin reuptake transporter in the brain and intestinal features of autism spectrum disorders and developmental antidepressant exposure. **Journal of chemical neuroanatomy**, 83, p. 36-40, 2017.

MARGOLIS, K. G.; CRYAN, J. F.; MAYER, E. A. The microbiota-gut-brain axis: from motility to mood. **Gastroenterology**, 160, n. 5, p. 1486-1501, 2021.

MENDEZ-DAVID, I.; DAVID, D. J.; DARCEY, F.; WU, M. V. *et al.* Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. **Neuropsychopharmacology**, 39, n. 6, p. 1366-1378, 2014.

MIALET-PEREZ, J.; SANTIN, Y.; PARINI, A. Monoamine oxidase-A, serotonin and norepinephrine: synergistic players in cardiac physiology and pathology. **Journal of Neural Transmission**, 125, p. 1627-1634, 2018.

MICHEL, L.; CECCARELLI, M.; D'ANDREA, G.; TIRONE, F. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. **Brain research bulletin**, 143, p. 181-193, 2018.

MOHAMMADI ZIARANI, G.; KHEILKORDI, Z.; MOHAJER, F. Recent advances in the application of acetophenone in heterocyclic compounds synthesis. **Journal of the Iranian Chemical Society**, 17, p. 247-282, 2020.

MOHAMMAD-ZADEH, L.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. Serotonin: a review. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, 31, n. 3, p. 187-199, 2008.

MORGESE, M. G.; TRABACE, L. Monoaminergic system modulation in depression and Alzheimer's disease: a new standpoint? **Frontiers in pharmacology**, 10, p. 483, 2019.

MÉNARD, C.; HODES, G. E.; RUSSO, S. J. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. **Neuroscience**, 321, p. 138-162, 2016.

NAMKUNG, H.; LEE, B. J.; SAWA, A., 2018, **Causal inference on pathophysiological mediators in psychiatry**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 17-23.

NOGUEIRA, N. F. N.; FERREIRA, V. S.; TEIXEIRA, A. N.; DE LEMOS NETO, M. *et al.* Doenças Negligenciadas: depressão. **Revista Interdisciplinar Pensamento Científico**, 4, n. 3, 2018.

NORDQUIST, N.; ORELAND, L. Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders-a review. **Upsala journal of medical sciences**, 115, n. 1, p. 2-10, 2010.

NUYTS, V.; NAWROT, T. S.; SCHEERS, H.; NEMERY, B. *et al.* Air pollution and self-perceived stress and mood: A one-year panel study of healthy elderly persons. **Environmental Research**, 177, p. 108644, 2019.

OLIFFE, J. L.; ROSSNAGEL, E.; SEIDLER, Z. E.; KEALY, D. *et al.* Men's depression and suicide. **Current psychiatry reports**, 21, p. 1-6, 2019.

O'LEARY, O. F.; BECHTHOLT, A. J.; CROWLEY, J. J.; HILL, T. E. *et al.* Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. **Psychopharmacology**, 192, n. 3, p. 357-371, 2007-02-21 2007. OriginalPaper.

P, R. H.; M, D. M.; M, R. J.; J, F. R. *et al.* **Rang & Dale's Pharmacology**. Elsevier: 2012. 778 p.

PACHER, P.; KECSKEMETI, V. Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? **Current medicinal chemistry**, 11, n. 7, p. 925-943, 2004.

PAN, X.; CHEN, L.; XU, W.; BAO, S. *et al.* Activation of monoaminergic system contributes to the antidepressant-and anxiolytic-like effects of J147. **Behavioural Brain Research**, 411, p. 113374, 2021.

PARDRIDGE, W., 1979, **The role of blood-brain barrier transport of tryptophan and other neutral amino acids in the regulation of substrate-limited pathways of brain amino acid metabolism**. Springer. 43-54.

PEHRSON, A.; ROBERTS, D.; KHAWAJA, A.; MCNAIR, R. The role of serotonin neurotransmission in rapid antidepressant actions. **Psychopharmacology**, 239, n. 6, p. 1823-1838, 2022.

PELTONIEMI, M. A.; HAGELBERG, N. M.; OLKKOLA, K. T.; SAARI, T. I. Ketamine: a review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia and pain therapy. **Clinical pharmacokinetics**, 55, p. 1059-1077, 2016.

PEREZ-CABALLERO, L.; TORRES-SANCHEZ, S.; ROMERO-LÓPEZ-ALBERCA, C.; GONZÁLEZ-SÁIZ, F. *et al.* Monoaminergic system and depression. **Cell and tissue research**, 377, p. 107-113, 2019.

PHAM, T. H.; GARDIER, A. M. Fast-acting antidepressant activity of ketamine: highlights on brain serotonin, glutamate, and GABA neurotransmission in preclinical studies. **Pharmacology & therapeutics**, 199, p. 58-90, 2019.

PHILIP BOYCE, C. M. Choosing an antidepressant. 2022.

PILOWSKY, P. M. **Serotonin: the mediator that spans evolution**. Academic Press: 2018.

PINHEIRO, C. **Escetamina, primeiro antidepressivo inalável, é aprovado no Brasil**. São Paulo - Brasil, 2020.

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, 126, p. 1383-1408, 2019.

POURHAMZEH, M.; MORAVEJ, F. G.; ARABI, M.; SHAHRIARI, E. *et al.* The roles of serotonin in neuropsychiatric disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 42, n. 6, p. 1671-1692, 2022.

PYTLIAK, M.; VARGOVÁ, V.; MECHÍROVÁ, V.; FELSÖCI, M. Serotonin receptors-from molecular biology to clinical applications. **Physiological research**, 60, n. 1, p. 15, 2011.

Q, W.; MA, T.; K, P.; Y, D. The recent progress in animal models of depression. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, 77, 07/03/2017 2017.

RANG, R.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & dale farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015. 8535265007.

REBELLO, J. D. M. Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas. 2005.

REDROBE, J.; BOURIN, M.; COLOMBEL, M.; BAKER, G. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, 138, n. 1, p. 1-8, 1998.

REZKI, N.; ALMEHMADI, M. A.; IHMAID, S.; SHEHATA, A. M. *et al.* Novel scaffold hopping of potent benzothiazole and isatin analogues linked to 1, 2, 3-

triazole fragment that mimic quinazoline epidermal growth factor receptor inhibitors: Synthesis, antitumor and mechanistic analyses. **Bioorganic Chemistry**, 103, p. 104133, 2020.

REZKI, N.; MAYABA, M. M.; AL-BLEWI, F. F.; AOUAD, M. R. *et al.* Click 1,4-regioselective synthesis, characterization, and antimicrobial screening of novel 1,2,3-triazoles tethering fluorinated 1,2,4-triazole and lipophilic side chain. **Research on Chemical Intermediates**, 43, n. 2, p. 995-1011, 2016-08-06 2016. OriginalPaper.

ROBINSON, N. B.; KRIEGER, K.; KHAN, F. M.; HUFFMAN, W. *et al.* The current state of animal models in research: A review. **International Journal of Surgery**, 72, p. 9-13, 2019.

RUDNICK, G.; SANDTNER, W. Serotonin transport in the 21st century. **Journal Of general physiology**, 151, n. 11, p. 1248-1264, 2019.

SANCHES, R. F.; DE LIMA OSÓRIO, F.; DOS SANTOS, R. G.; MACEDO, L. R. *et al.* Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a SPECT study. **Journal of clinical psychopharmacology**, 36, n. 1, p. 77-81, 2016.

SAÚDE, O. M. D. Depression. 2021.

SAÚDE, O. P.-A. D.; SAÚDE, O. M. D. Depression. 2022.

SCHILL, Y.; BIJATA, M.; KOPACH, O.; CHERKAS, V. *et al.* Serotonin 5-HT₄ receptor boosts functional maturation of dendritic spines via RhoA-dependent control of F-actin. **Communications Biology**, 3, n. 1, p. 76, 2020.

SEO, D.; PATRICK, C. J.; KENNEALY, P. J. Role of serotonin and dopamine system interactions in the neurobiology of impulsive aggression and its comorbidity with other clinical disorders. **Aggression and violent behavior**, 13, n. 5, p. 383-395, 2008.

SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; FISHER, S. K. *et al.* **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Philadelphia: Lippincott-Raven: 1999.

SINGH, K.; PAL, R.; KHAN, S.; KUMAR, B. *et al.* Insights into the structure activity relationship of nitrogen-containing heterocyclics for the development of antidepressant compounds: An updated review. **Journal of Molecular Structure**, 1237, 2021.

STURMAN, O.; GERMAIN, P.-L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, 21, n. 5, p. 443-452, 2018.

SÖDERLUND, J.; LINDSKOG, M. Relevance of rodent models of depression in clinical practice: can we overcome the obstacles in translational neuropsychiatry? **International Journal of Neuropsychopharmacology**, 21, n. 7, p. 668-676, 2018.

TACIAK, P. P.; LYSENKO, N.; MAZUREK, A. P. Drugs which influence serotonin transporter and serotonergic receptors: pharmacological and clinical properties in the treatment of depression. **Pharmacological Reports**, 70, n. 1, p. 37-46, 2018.

TAMBURELLA, A.; MICALE, V.; NAVARRIA, A.; DRAGO, F. Antidepressant properties of the 5-HT₄ receptor partial agonist, SL65. 0155: behavioral and neurochemical studies in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 33, n. 7, p. 1205-1210, 2009.

TIGER, M.; VARNÄS, K.; OKUBO, Y.; LUNDBERG, J. The 5-HT_{1B} receptor-a potential target for antidepressant treatment. **Psychopharmacology**, 235, n. 5, p. 1317-1334, 2018.

TREADWAY, M. T. The neurobiology of motivational deficits in depression—an update on candidate pathomechanisms. **Behavioral Neuroscience of Motivation**, p. 337-355, 2016.

VAN DEN EYNDE, V.; ABDELMOEMIN, W. R.; ABRAHAM, M. M.; AMSTERDAM, J. D. *et al.* The prescriber's guide to classic MAO inhibitors (phenelzine, tranylcypromine, isocarboxazid) for treatment-resistant depression. **CNS spectrums**, p. 1-14, 2022.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological bulletin**, 83, n. 3, p. 482, 1976.

WALTHER, D. J.; PETER, J.-U.; BASHAMMAKH, S.; HORTNAGL, H. *et al.* Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**, 299, n. 5603, p. 76-76, 2003.

WANG, J.; WU, G.; CHU, H.; WU, Z. *et al.* Paeonol derivatives and pharmacological activities: a review of recent progress. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 20, n. 6, p. 466-482, 2020.

WANG, Q.; TIMBERLAKE II, M. A.; PRALL, K.; DWIVEDI, Y. The recent progress in animal models of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 77, p. 99-109, 2017.

ZUBKOV, F. I.; KOUZNETSOV, V. V. Traveling across Life Sciences with Acetophenone—A Simple Ketone That Has Special Multipurpose Missions. **Molecules**, 28, n. 1, p. 370, 2023.

ŚLIFIRSKI, G.; KRÓL, M.; TURŁO, J. 5-HT receptors and the development of new antidepressants. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 16, p. 9015, 2021.

ANEXO



PARECER N°
PROCESSO N°

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
12/2020/CEEA/REITORIA
23110.050890/2019-77

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito do tipo antidepressivo de 1,2,3-triazolil-acetofenonas em camundongos**”, registrada com o n° 23110.050890/2019-77, sob a responsabilidade de **César Augusto Bruning** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **17 de dezembro de 2019**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	02/03/2020 a 02/03/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss
N° de animais	505
Idade	60 dias
Sexo	493 machos e 12 fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro n° **CEEA 50890-2019**

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 17/01/2020, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0848746** e o código CRC **BE5EA12F**.

Referência: Processo nº 23110.050890/2019-77

SEI nº 0848746