



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AXEL FOGAÇA ROSADO**

**Efeito da glibenclamida sobre a neuroinflamação e alterações comportamentais  
induzidas pelo estresse crônico imprevisível em camundongos fêmea**

**FLORIANÓPOLIS**

**2019**

Axel Fogaça Rosado

**Efeito da glibenclamida sobre a neuroinflamação e alterações comportamentais  
induzidas pelo estresse crônico imprevisível em camundongos fêmea**

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito para a obtenção do Título  
de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Manuella Pinto Kaster  
Co-orientador: Dra. Fernanda Neutzling Kaufmann

Florianópolis  
2019

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

Rosado, Axel

Efeito da glibenclamida sobre a neuroinflamação e alterações comportamentais induzidas pelo estresse crônico imprevisível em camundongos fêmea / Axel Rosado ; orientador, Manuella Kaster, coorientador, Fernanda Kaufmann, 2019.

54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Depressão. 3. Neuroinflamação. 4. Glibenclamida. I. Kaster, Manuella . II. Kaufmann, Fernanda. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Axel Fogaça Rosado

EFEITO DA GLIBENCLAMIDA SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO E  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO  
IMPREVISIVEL EM CAMUNDONGOS FÊMEA

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Título de Licenciado em  
Ciências Biológicas

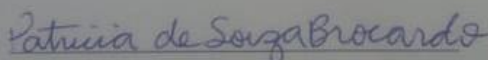
Florianópolis, 13 de dezembro de 2019

**Banca Examinadora:**



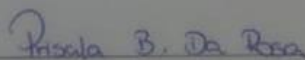
Prof.ª Dr.ª Manuella Pinto Kaster

Presidente da banca – Orientadora



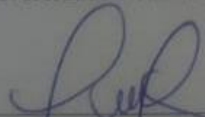
Prof.ª Dr.ª Patricia de Sousa Brocardo

Universidade Federal de Santa Catarina



Msc.ª Priscila Batista da Rosa

Universidade Federal de Santa Catarina



Dr. Filipe Marques Gonçalves

Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, minha mãe Ivonir, meu pai Fernando e meu irmão Bryan, por toda a educação, aprendizagem, suporte e carinho durante minha vida. Toda a estrutura e oportunidades criadas com os seus sacrifícios, agradeço muito por tudo. Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina pelas condições de poder proporcionar um ensino de qualidade e diferenciado para seus alunos e frequentadores, com seus professores, técnicos e terceirizados. Gostaria de agradecer ao LAMEB e seus funcionários pelo apoio e disposição em auxiliar e ajudar sempre que necessário.

Gostaria de agradecer ao LANED, a professora Ana, que sempre esteve disponível para me ajudar sempre que pedi, sempre disposta e carinhosa. A Vivian, que é a minha parceira para todas as horas, conversas, dúvidas e risadas. Ao Anderson e Júlia pelo apoio e conversas. As ICs maravilhosas Isabel e Yasmin, por todos os momentos juntos.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Manuella, essa pessoa maravilhosa e querida, que me acolheu de braços abertos em todos os momentos, sempre disposta, sempre carinhosa, que segue como um modelo de pesquisadora, professora e pessoa, na qual me baseio e busco me tornar um dia.

Gostaria de agradecer a minha co-orientadora, Fernanda, essa pessoa mais querida do mundo e que admiro, que apesar do pouco tempo que passamos junto eu sinto como se fosse uma irmã mais velha, 1 ano mais velha, que aprendi muitas coisas, muitas conversas, e também é alguém que me baseio muito para o futuro.

Gostaria de agradecer as minhas colegas de laboratório, Nicolle, minha maior parceira nessa jornada, que me ensinou tudo que sei sobre o laboratório, metodologias, protocolos, análises, sem ela não chegaria tão longe, e que também está de braços abertos para me receber sempre que preciso de apoio, sou muito agradecido pela sua presença. Também gostaria de agradecer a Bruna, que me trata como um filho, preocupada e sempre disposta a ajudar, torcendo por mim.

Por fim gostaria de agradecer a todos os animais utilizados para esta pesquisa, que fundamentam nosso trabalho e sacrificam suas vidas para que possamos melhorar a nossa. Muito obrigado por tudo.

## RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma condição psiquiátrica recorrente e debilitante, com uma maior prevalência em mulheres do que em homens. Estudos demonstram que o estresse crônico, considerado o principal fator de risco ambiental para o TDM, pode promover alterações neuroquímicas e imunológicas, desencadeando um aumento no perfil inflamatório em pacientes com TDM e em modelos animais de depressão. Neste contexto, o controle de respostas inflamatórias no sistema nervoso central (SNC) pode representar um importante mecanismo associado aos efeitos do estresse e vulnerabilidade ao TDM. O inflamassoma NLRP3 é um complexo proteico citosólico responsável por maturar as citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas ativas, que são posteriormente secretadas. Em pacientes com TDM, estudos têm demonstrado aumento na expressão de NLRP3 em células imunes periféricas. Além disso, modelos em roedores sugerem que o estresse é capaz de ativar a via do inflamassoma NLRP3 em áreas encefálicas que regulam o humor, como o hipocampo e o córtex pré-frontal. Nosso objetivo foi avaliar o papel da via do inflamassoma NLRP3 na regulação do humor e seu potencial como alvo terapêutico em situações de estresse crônico e depressão. Para tal, camundongos *Swiss* fêmeas (45 dias de idade) foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) por 21 dias, para induzir um comportamento tipo-depressivo. Os animais foram tratados durante todo o protocolo de ECI com glibenclamida (5 mg/kg, p.o.), um inibidor de canais de potássio Sur1-Kir6.2 e Sur1-Trpm4 que reduz a ativação do inflamassoma NLRP3. O ECI induziu um comportamento tipo-depressivo, avaliado pelo teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado, e também um prejuízo na memória espacial de curto prazo, avaliada através do teste de reconhecimento de objeto. Além disso, no córtex pré-frontal, o ECI induziu um aumento nos receptores de glicocorticoides, mensurados por Western Blot, juntamente com um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$ , avaliados por ELISA. Do ponto de vista comportamental, o tratamento com glibenclamida foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo e o prejuízo de memória induzido pelo ECI. Do ponto de vista neuroquímico, a glibenclamida reverteu o aumento de IL-1 $\beta$ , e reverteu parcialmente o aumento nos níveis dos receptores de glicocorticoides no córtex pré-frontal induzido pelo ECI. Não observamos alterações nos níveis da proteína microglial Iba-1, ou das proteínas NLRP3 e pró-caspase-1 no córtex pré-frontal nos grupos submetidos ao ECI e/ou tratados com glibenclamida. Além disso, os níveis de Iba-1, das proteínas da via do inflamassoma NLRP3 (NLRP3, pró-caspase-1, IL-1 $\beta$ ) ou dos receptores de glicocorticoides não foram alterados no hipocampo após o ECI e/ou tratamento com glibenclamida. Assim, este estudo sugere que o tratamento crônico com glibenclamida previne o comportamento tipo-depressivo e déficit de memória induzido pelo estresse crônico em fêmeas. O efeito farmacológico parece ser mediado, em parte, pela normalização dos níveis dos receptores de glicocorticoides e de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal. Contudo, o papel da via do inflamassoma NLRP3 ou de outras vias que regulam a neuroinflamação ainda precisa ser melhor elucidado.

**Palavras-chave:** estresse, comportamento, NLRP3, inflamação.

## ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is a recurrent and debilitating psychiatric disorder with a higher prevalence in women. Studies have shown that chronic stress, considered the leading environmental risk factor for MDD, may promote neurochemical alterations and immune system dysregulation, driving an inflammatory profile both in patients with MDD and in animal models of depression. In this sense, the control of inflammatory responses in the central nervous system might represent an important mechanism associated with stress effects and MDD vulnerability. The NLRP3 inflammasome is a cytosolic protein complex responsible for maturing the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 into their active and secreted forms. Increased NLRP3 mRNA expression and protein levels have been demonstrated in different brain areas of mice submitted to animal models of depression and in peripheral immune cells of patients with MDD. Our aim was to investigate the role of the NLRP3 inflammasome pathway in mood regulation and its potential as a therapeutic target against chronic stress and depression. To this end, female Swiss mice (45 days old) were submitted to the chronic unpredictable stress protocol (CUS) for 21 days, to induce depressive-like behavior. The animals were treated with glibenclamide, a Sur1-Kir6.2, Sur1-Trpm4 potassium channel inhibitor, which also decreases NLRP3 inflammasome activation. The CUS caused a depressive-like behavior in the tail suspension test and forced swimming test, as well as an impairment in spatial short-term memory assessed by the object recognition test. Moreover, CUS increased the levels of glucocorticoid receptors (measured by Western Blot) and the levels of IL-1 $\beta$  (measured by ELISA) in the prefrontal cortex. The behavioral analysis showed that treatment with glibenclamide (5 mg/kg, p.o., for 21 days) was able to prevent depressive-like behavior and CUS-induced memory changes. From a neurochemical perspective, glibenclamide prevented the increase in IL-1 $\beta$ , and partially prevented the increase in glucocorticoid receptor levels in the prefrontal cortex induced by CUS. We did not observe changes in NLRP3 or pro-caspase-1 levels in the prefrontal cortex after CUS and/or glibenclamide treatment. Additionally, NLRP3-related proteins (NLRP3, pro-caspase-1, IL-1 $\beta$ ) and glucocorticoid receptors were not altered in the hippocampus of mice following CUS and/or treatment with glibenclamide. Thus, this study suggests that chronic treatment with glibenclamide prevents depressive-like behavior and memory deficits induced by chronic stress in female mice. The pharmacological effect might be mediated, in part, by the normalization of glucocorticoid receptors and IL-1 $\beta$  levels in the prefrontal cortex. However, the role of the NLRP3 inflammasome pathway or other pathways that regulate neuroinflammation still needs further clarification.

**Keywords:** stress, behavior, NLRP3, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal .....	15
<b>Figura 2.</b> Formação do complexo do inflamassoma NLRP3.....	18
<b>Figura 3.</b> Delineamento do estudo.....	22
<b>Figura 4.</b> Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida no comportamento tipo-depressivo e na locomoção espontânea.....	29
<b>Figura 5.</b> Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida na memória de curto prazo.....	30
<b>Figura 6.</b> Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida nos níveis de receptores de glicocorticoides.....	32
<b>Figura 7.</b> Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida nos níveis de Iba-1.....	34
<b>Figura 8.</b> Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida nos níveis de NLRP3 .....	36
<b>Figura 9.</b> Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida nos níveis da enzima caspase-1 total.....	37
<b>Figura 10.</b> Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida nos níveis da citocina IL-1 $\beta$ .....	38



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

DA - Dopamina

DAMP - Padrão molecular associado ao dano

DMSO - Dimetilsulfóxido

ECI - Estresse crônico imprevisível

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

GR - Receptores de glicocorticoides

HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

IL - Interleucina

IL-18 - Interleucina-18

IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$

INF- $\alpha$  – Interferon- $\alpha$

NA - Noradrenalina

NF $\kappa$ B – Fator de transcrição nuclear kappa B

NLRP3 - Família de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3

PAMP - Padrão molecular associado a patógenos

SDS PAGE - Gel de poliacrilamida para eletroforese contendo dodecilsulfato de sódio

SNC - Sistema nervoso central

TCA - Teste do campo aberto

TDM – Transtorno depressivo maior

TNF - Teste do nado forçado

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TRO - Teste de realocação de objeto

TSC - Teste de suspensão pela cauda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR: EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO .....	12
1.2. ESTRESSE CRÔNICO E O TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR .....	13
1.3. ESTRESSE CRÔNICO, TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR E INFLAMAÇÃO .....	16
1.4. JUSTIFICATIVA.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1. ANIMAIS E TRATAMENTO .....	21
4.2. PROTOCOLO .....	22
4.3. TESTES COMPORTAMENTAIS .....	23
4.3.1. <b>Teste de suspensão pela cauda</b> .....	23
4.3.2. <b>Teste do nado forçado</b> .....	24
4.3.3. <b>Teste do campo aberto</b> .....	24
4.3.4. <b>Teste de realocação de objeto</b> .....	24
4.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	25
4.4.1. <b>Western Blot</b> .....	25
4.4.2. <b>Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)</b> .....	26
4.4.4. <b>Dosagem de proteínas</b> .....	27
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>5. RESULTADOS</b> .....	28
5.1. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL E PELO TRATAMENTO COM GLIBENCLAMIDA .....	28
5.1.1. <b>Comportamento tipo-depressivo</b> .....	28
5.1.2. <b>Memória de curto prazo</b> .....	29
5.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM GLIBENCLAMIDA SOBRE AS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL .....	30

5.2.1. Níveis de Receptores de glicocorticóides.....	30
5.3. EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISIVEL E TRATAMENTO COM GLIBENCLAMIDA SOBRE ALTERAÇÕES NEUROINFLAMATÓRIAS .....	33
5.3.1 Níveis da proteína Iba-1 .....	33
5.3.2. Níveis da proteína NLRP3.....	34
5.3.3. Níveis da proteína caspase-1 total .....	36
5.3.3 Níveis de IL-1 $\beta$ .....	37
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	44
8. REFERÊNCIAS.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR: EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM), também conhecido como depressão maior, é um dos subtipos de transtornos de humor mais estudados e com alta prevalência e incidência na população, sendo esperado que ao longo da vida 20% da população seja afetada por esse transtorno de humor (KESSLER e BROMET, 2013). O TDM é caracterizado por alterações cognitivas, afetivas, comportamentais e fisiológicas, com diagnósticos de um episódio ou mais ao longo da vida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). O diagnóstico de TDM leva a consequências tanto na vida dos indivíduos quanto para seus familiares, além disso, possui um grande impacto socioeconômico, pois atualmente é considerada a maior causa de incapacidade mundial e o maior contribuidor para mortes por suicídio (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, os índices de impacto econômico demonstram que o TDM possui um gasto médio de 6 mil dólares por pessoa por ano, devido a incapacitação e diminuição de produtividade gerados pelo transtorno (EVANS-LACKO e KNAPP, 2016). Entretanto, os gastos relacionados a este transtorno também envolvem a falta de aderência aos tratamentos farmacológicos, tendo em vista que os pacientes não concluem o tratamento, aumentando as chances de episódios recorrentes (HO et al., 2016).

Até o momento, o diagnóstico para o TDM é realizado através de uma entrevista clínica utilizando os critérios listados pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição (DSM-5). Os sintomas incluem humor deprimido, anedonia (diminuição do prazer em atividades anteriormente prazerosas), dificuldades de concentração, irritabilidade, alterações no apetite e sono, ideação suicida, entre outros, como demonstrado no quadro 1 (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

### Quadro 1. Sintomas do transtorno depressivo maior segundo DSM-5

Transtorno Depressivo Maior – Critério diagnóstico segundo DSM-5	
1	Humor deprimido
2	Anedonia
3	Perda ou ganho significativo de peso
4	Insônia ou hipersônia
5	Agitação ou retardo psicomotor
6	Fadiga ou perda de energia
7	Sentimentos de inutilidade ou culpa
8	Capacidade diminuída para pensar, concentrar-se ou decidir
9	Pensamentos recorrentes de morte, ideação ou tentativa de suicídio

Fonte: Adaptado de AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013

As bases neurobiológicas do TDM não estão completamente elucidadas, indicando uma disfunção multifatorial que envolve diferentes áreas encefálicas como córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens, tálamo e hipotálamo, além de diferentes células como neurônios, astrócitos e micróglia, e diferentes neurotransmissores e vias bioquímicas. Cabe ressaltar que o TDM possui influências tanto genéticas quanto ambientais (KRISHNAN e NESTLER, 2008; NEMEROFF e OWENS, 2002; NESTLER et al., 2002). Além disso, grandes diferenças são observadas na manifestação e progressão do TDM entre homens e mulheres. O TDM é de 2 a 3 vezes mais prevalente em mulheres do que homens. Mulheres exibem maior gravidade dos sintomas, maior comprometimento funcional, sintomas depressivos mais atípicos e maiores taxas de comorbidade com ansiedade. Além disso, homens e mulheres com TDM apresentam um padrão diferencial de expressão gênica, e respondem de maneira diferente ao tratamento antidepressivo (LABONTÉ et al., 2017).

#### 1.2. ESTRESSE CRÔNICO E O TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

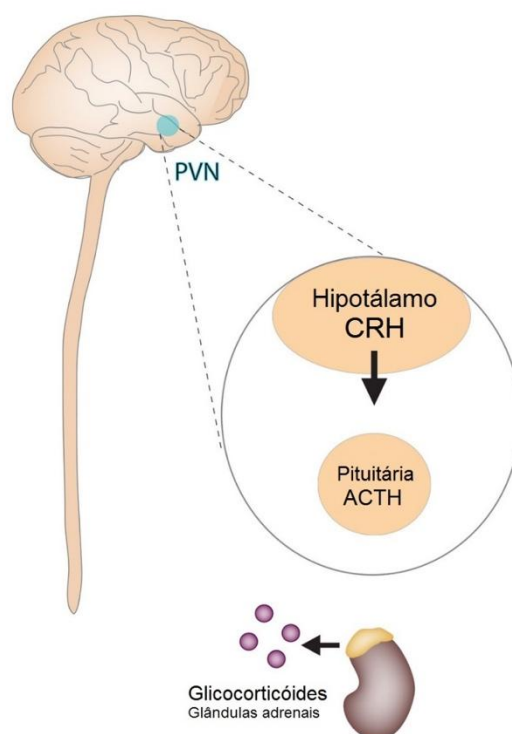
Estudos epidemiológicos relacionam eventos estressantes durante a vida como o principal fator ambiental envolvido na fisiopatologia do TDM. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é o principal eixo neuroendócrino de resposta ao estresse (Figura 1). Este eixo responde a situações de estresse ao secretar o hormônio liberador de corticotrofina (*corticotrophin-releasing hormone* - CRH) pelos neurônios dos núcleos paraventriculares do hipotálamo. O CRH é transportado por meio do sistema porta hipofisário até a pituitária, onde

estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotrophic hormone* - ACTH). O ACTH atinge a circulação e estimula a produção de glicocorticoides (GC) pelas células do córtex da glândula adrenal, sendo o cortisol o principal GC secretado na espécie humana e a corticosterona em roedores (NEIS et al., 2017; JURUENA, CLEARE e PARIANTE, 2004). No sistema nervoso central (SNC), os GCs interagem com receptores de GC (GR) expressos no hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, núcleo accumbens e outras regiões límbicas, que modulam a circuitaria neural responsável pelo comportamento durante episódios de estresse (DUDEK et al., 2019). A regulação do eixo HPA ocorre por um mecanismo de retroinibição, e níveis elevados de GC ligam-se aos receptores de GC expressos no hipocampo, hipotálamo, e na pituitária, inibindo a ativação do eixo HPA e a sua própria secreção. Este mecanismo é responsável pelo retorno dos níveis basais de GC, a homeostase do organismo, na medida que os eventos estressores cessam (WALKER e SPENCER, 2017).

O estresse é capaz de desregular o eixo HPA e a produção de GC (SMITH e VALE, 2006; OTTE et al., 2016). Diferentes áreas límbicas e corticais, associadas a regulação do comportamento emocional e cognição, são afetadas pela desregulação do eixo HPA. O hipocampo é uma estrutura localizada nos lobos temporais, associada com a formação e consolidação da memória, navegação espacial e integração de estímulos sensoriais, cognitivos e comportamentos emocionais (KNIERIM, 2015). Esta região possui um grande número de receptores de GC, e seus neurônios são particularmente sensíveis a uma elevação nos níveis de GC. Portanto uma hiperativação do eixo HPA pode gerar modificações no funcionamento e morfologia desta região, provocando uma diminuição da neurogênese hipocampal e uma redução de espinhos dendríticos, que resultam em uma atrofia do hipocampo (FINSTERWALD e ALBERINI, 2015; SHELINE et al., 2003; SAPOLSKY et al., 1990). Além dos prejuízos comportamentais, a atrofia hipocampal pode propagar os prejuízos nos mecanismos de retroinibição do eixo HPA, levando a um aumento sustentado dos níveis de GC (DUDEK et al., 2019). Foi demonstrado que o estresse também provoca uma atrofia de espinhos dendríticos e dendritos generalizada, causando uma diminuição no volume do córtex pré-frontal (CHRISTOFFEL, GOLDEN e RUSSO, 2011). O córtex pré-frontal está localizado na porção anterior do córtex cerebral, imediatamente anterior ao córtex motor primário e possui extensa conexão com áreas sensoriais e com o sistema límbico. O córtex pré-frontal funciona como um centro de integração envolvido na formação da memória, planejamento, execução, processamento de informações de ordem superior e supressão de comportamentos indesejados (HIKA e AL KHALILI, 2019).

Além das alterações morfológicas, o aumento nos níveis de GC pode causar alterações funcionais em diversos circuitos encefálicos. Os GCs podem influenciar o sistema glutamatérgico, através de diversos pontos de regulação sináptica, como a liberação pré-sináptica de glutamato, seus receptores pós-sinápticos e receptores seletivos. Logo, a exposição ao estresse aumenta rapidamente a liberação de glutamato no córtex pré-frontal, causando uma excitotoxicidade glutamatérgica (BAGLEY e MOGHADDAM, 1997; MOGHADDAM, 1993; POPOLI et al., 2011). O estresse ainda pode afetar a plasticidade sináptica, através de potenciais de longa duração (*long term potentiation* - LTP) e depressão de longa duração (*long term depression* - LTD), na comunicação do hipocampo com o córtex pré-frontal, onde foi demonstrado que o bloqueio dos receptores de GC previne estas alterações (MAILLIET et al., 2008; KLOET, JOËLS e HOLSBOER, 2005; ROCHER et al., 2004; POPOLI et al., 2011). Além disso, o estresse causa um aumento no número de agentes oxidantes e diminui os mecanismos de defesa antioxidantes, juntamente com alterações nas vias serotoninérgicas e GABAérgicas (BELLEAU, TREADWAY e PIZZAGALLI, 2019).

### Figura 1. Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal



**Figura 1.** O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é um dos principais sistemas neuroendócrinos recrutados para promover e manter a manutenção da homeostase do organismo frente a episódios de estresse. A exposição ao estresse físico ou psicológico gera a ativação de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo, que liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH entra

na corrente sanguínea atingindo a região anterior da glândula pituitária interagindo com receptores específicos, que induzem a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação. O ACTH por sua vez age no córtex da glândula adrenal promovendo a liberação de glicocorticóides (GC) (Adaptado de Dudek et al., 2019).

Os modelos animais que investigam a fisiopatologia do TDM, utilizam diferentes eventos estressores para o desenvolvimento de alterações comportamentais que tentam mimetizar os sintomas humanos da doença, incluindo o comportamento tipo-depressivo, presença de anedonia e redução na motivação, ansiedade, entre outros. Os agentes estressores são aplicados de forma aguda ou crônica tentam prever a eficácia de compostos farmacológicos, bem como o efeito da depleção de genes específicos e de manipulações ambientais que podem estar associadas aos sintomas. Entre os modelos de estresse crônico mais utilizados podemos destacar o estresse crônico imprevisível (ECI), estresse crônico de derrota social e o estresse crônico de contenção. Foi demonstrado que o ECI causa prejuízos no comportamento, cognição e memória (QIAO et al., 2016; WILLNER, 2016; ANTONIUK et al., 2019), incluindo atrofia de regiões corticais e límbicas (MARSDEN, et al., 2013), diminuição da neurogênese hipocampal (SCHOENFELD et al., 2017), alterações serotoninérgicas e noradrenérgicas (PEREIRA, CARVALHO e PADOVAN, 2019), proliferação e ativação microglial (WANG et al., 2017) e desregulações do eixo HPA (MÉNARD et al., 2016).

### 1.3. ESTRESSE CRÔNICO, TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR E INFLAMAÇÃO

Apesar de haver alguma heterogeneidade entre os estudos, pacientes com TDM apresentam níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, como proteína C-reativa, interleucinas (IL)-1 $\beta$  e IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (DOWLATI et al., 2010; HOWREN et al., 2009), sugerindo um importante papel do sistema imune na fisiopatologia do TDM (YANG et al., 2015; MÉNARD et al., 2017).

Inicialmente a relação do estresse com o sistema imune, através dos GCs, possui um efeito anti-inflamatório e imunossupressor, na qual a interação destas moléculas com leucócitos periféricos modula sua ativação, inibindo as atividades de linfócitos T e causando apoptose de eosinófilos e monócitos circulantes. A ação aguda de GCs reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-6 e fatores de crescimento associados a inflamação, como fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (CHROUSOS, 1995; BOUMPAS et al., 1993). A exposição crônica ao estresse está associada às mudanças fenotípicas das células imunológicas, de um



perfil anti-inflamatório para um perfil pró-inflamatório, tornando-as insensíveis e resistentes aos efeitos dos GCs, com um aumento da secreção de citocinas periféricas ((DHABHAR et al., 2012; HEIDT et al., 2014; WEBER, GODBOUT e SHERIDAN, 2016; CHROUSOS, DETERA-WADLEIGH e KARL, 1993).

Em modelos animais de estresse, um aumento no fenótipo pró-inflamatório também é observado, tanto periféricamente quanto no SNC. O estresse crônico está associado a níveis elevados de citocinas inflamatórias, mudanças nas células imunes periféricas para um fenótipo pró-inflamatório, e perda da sensibilidade destas células aos efeitos anti-inflamatórios dos GC (BARNES e ADCOCK, 2009; COHEN et al., 2012). A hiperativação do eixo HPA estimula a ativação das células imunológicas, guiando-as à um perfil pró-inflamatório, promovendo a produção de citocinas periféricas, que atingem o SNC, potencializando a resposta inflamatória central e periférica (POWELL et al., 2013; OTTE et al., 2016; FRANK, WATKINS e MAIER, 2015).

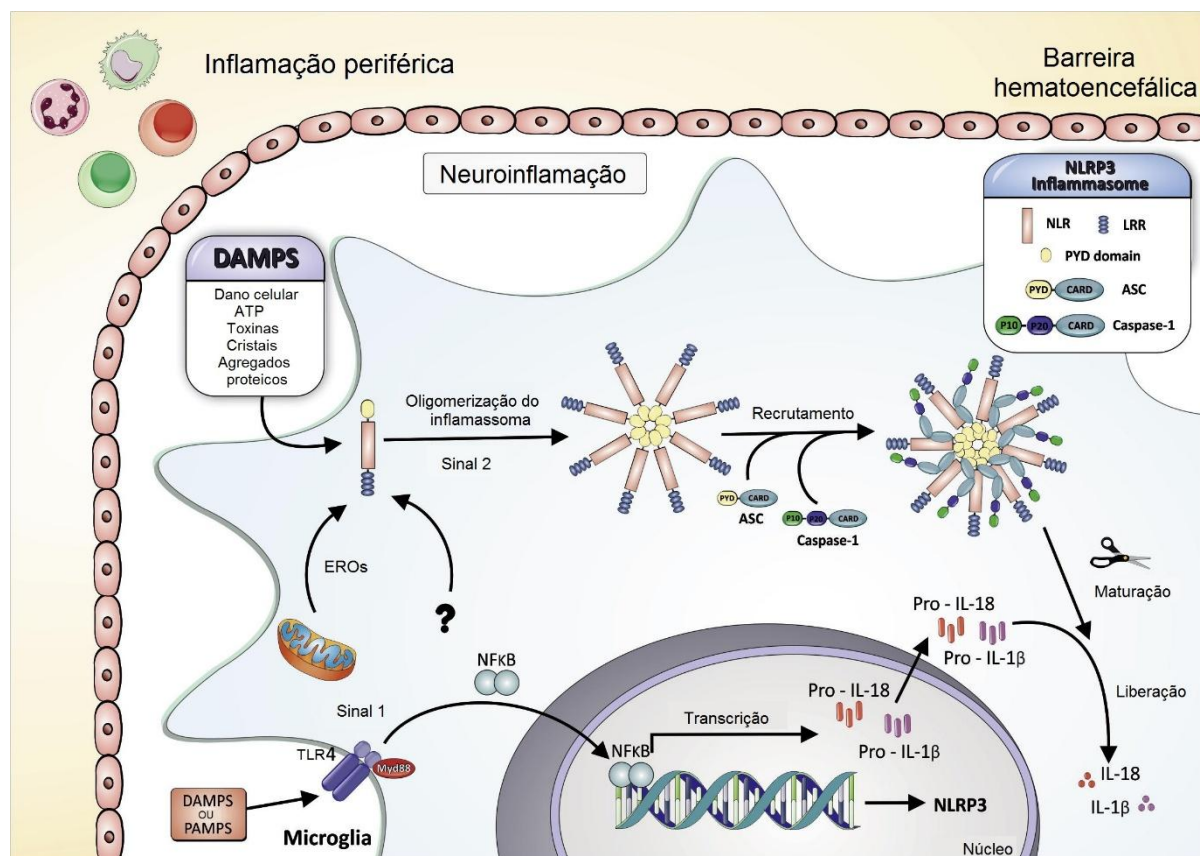
Uma vez no SNC, estímulos danosos levam a formação e ativação de complexos multiproteicos chamados de inflamassomas que iniciam ou potencializam a resposta inflamatória (KAUFMANN et al., 2017). Dentre os tipos de inflamassoma, o NLRP3 (família de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3) é o mais estudado, pois está intimamente relacionado ao processo inflamatório e maturação de citocinas pró-inflamatórias (FRANK et al., 2014; FRANK, WATKINS e MAIER, 2015). O inflamassoma NLRP3 está presente em células do sistema imunológico periférico, e no SNC é encontrado principalmente nas células da micróglia (PAN et al., 2014).

Seu mecanismo de ativação requer dois sinais distintos, que podem ser iniciados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). O primeiro sinal, também chamado de *priming*, pode ser iniciado através de diferentes interações moleculares, como as ligações de lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana (LPS) aos receptores do tipo Toll (TLR) e fatores de necrose tumoral (TNF) aos receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR). Esta ligação induz a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), sua translocação para o núcleo, e a indução da transcrição dos genes que codificam as pró-formas das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e da própria proteína do NLRP3 (SWANSON, DENG e TING, 2019; KIGERL et al., 2014; TSUCHIYA e HARA, 2014).

O segundo sinal pode ser desencadeados por diversos processos, incluindo: efluxo de potássio através de canais sensíveis a ATP, um influxo de cálcio, através de canais não seletivos de íons, interações virais, espécies reativas de oxigênio, lipoproteína de baixa densidade,

agregados celulares, como peptídeo A $\beta$ , cristais de sílica, além de disfunções do complexo de Golgi e mitocôndria. O segundo sinal induz a oligomerização do complexo NLRP3, através do recrutamento da proteína adaptadora ASC e da ativação da enzima pró-caspase-1 em caspase-1 madura, a qual por sua vez, cliva as pró-formas das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas também maduras, que podem ser liberadas das células iniciando uma resposta inflamatória, conforme ilustrado na Figura 2 (SWANSON, DENG e TING, 2019; WOHLEB et al., 2016; WALSH, MURUVE e POWER, 2014; SINGHAL et al., 2014).

**Figura 2. Formação do complexo inflamassoma NLRP3**



**Figura 2.** A ativação do inflamassoma depende de dois sinais. Primeiramente ocorre o reconhecimento de um DAMP ou PAMP pelos TLR, geralmente o TLR-4, o qual induz uma sinalização intracelular levando à ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde ele estimula a transcrição dos genes das formas imaturas de IL-1 $\beta$  e IL-18 e os próprios componentes do inflamassoma. Um segundo sinal, é necessário para induzir a oligomerização dos NLRP3, seguido pelo recrutamento da proteína adaptadora ASC e o recrutamento e ativação da pró-caspase-1 em caspase-1 madura. Uma vez que a caspase-1 é ativada (não mostrado), o inflamassoma NLRP3 pode processar as pró-formas de IL-1 $\beta$  e IL-18 em interleucinas maduras que são liberadas e podem atuar como mediadores pró-inflamatórios. Abreviações: DAMP – Padrão molecular associado à patógenos, NF $\kappa$ B – Fator de transcrição nuclear kappa B, PAMP – Padrão molecular associado à dano, IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta, IL-18 – Interleucina 18, ERO – Espécies reativas de oxigênio, ASC - Proteína adaptadora de CARD, NLRP3 - Família de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3 (Adaptado de KAUFMANN et al., 2017).

Estudos recentes apontam para o envolvimento do inflamassoma NLRP3 na patologia da TDM, visto que, as citocinas inflamatórias controladas pelo inflamassoma estão aumentadas nesta patologia (ALCOCER-GÓMEZ e CORDERO, 2014; IWATA et al., 2013; SINGHAL et al., 2014). O aumento da expressão do inflamassoma NLRP3 e dos componentes da via do NF- $\kappa$ B foi observado no córtex de ratos expostos ao estresse crônico, principalmente na micróglia, efeitos que foram revertidos pelo tratamento com fluoxetina (PAN et al., 2014). Desta forma, a ativação do inflamassoma NLRP3 pode desencadear ou exacerbar a resposta inflamatória no SNC contribuindo para o desenvolvimento do TDM. Assim, a inibição da formação do complexo NLRP3 tem-se demonstrado promissora como forma de combater os sintomas do TDM levando a uma diminuição da inflamação associada a esse transtorno (KAUFMANN et al., 2017).

O fármaco hipoglicemiante glibenclamida é capaz de atuar nos receptores de sulfoniluréias do tipo 1, que regulam os canais de potássio sensíveis a ATP Sur1-Kir6.2 e os canais não seletivos sensíveis ao cálcio Sur1-Trpm4. Estes canais estão presentes em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais e micróglia (SIMARD et al., 2012). O tratamento com glibenclamida é capaz de inibir os dois canais, Sur1-Kir6.2 e Sur1-Trpm4, diminuindo a ativação do inflamassoma NLRP3, que por consequência, diminui os níveis de IL-1 $\beta$  (SU et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que a administração de glibenclamida melhora o comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado (KASTER et al., 2007), e o comportamento depressivo e anedônico induzido por 12 semanas de estresse ou pela administração de peptídeo A $\beta$  (SU et al., 2017; ESMAEILI, BAHARI e SALARI, 2018). Contudo, o potencial efeito benéfico da glibenclamida como uma estratégia farmacológica capaz de conter a inflamação periférica e a neuroinflamação associada ao TDM precisa ser melhor elucidada.

#### 1.4. JUSTIFICATIVA

O TDM é uma doença psiquiátrica com alta prevalência na população, atingindo cerca de 300 milhões de pessoas, atualmente sendo a maior causa de incapacidade mundial (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al, 2013; WHO, 2017). Além disso, 30% a 50% dos pacientes diagnosticados com TDM não respondem de maneira eficiente aos tratamentos convencionais com fármacos que atuam na modulação de monoaminas (KRISHNAN e NESTLER, 2008). O diagnóstico do TDM ocorre apenas com base nos sintomas relatados e observados no paciente, entretanto a heterogeneidade de alterações

presentes na sua fisiopatologia é alta, o que explica o motivo de parte dos pacientes não responderem, ou não responderem completamente, ao tratamento convencional que tem no metabolismo de monoaminas seu alvo primário (DUMAN et al., 2016). Além disso, a prevalência do TDM é maior em mulheres, e diversas diferenças comportamentais e neuroquímicas na resposta ao estresse e nos mecanismos associados ao TDM já foram relatados entre homens e mulheres. Assim, a investigação de alterações em mecanismos alternativos aos monaminérgicos, como alterações no sistema imunológico, assim como a busca por compostos com outros alvos primários de ação, pode auxiliar no desenvolvimento de diferentes estratégias e abordagens farmacológicas terapêuticas para o tratamento deste transtorno.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com glibenclamida nas alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroinflamatórias desencadeadas pelo estresse crônico imprevisível em camundongos fêmeas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Verificar o efeito do tratamento crônico com glibenclamida sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível;
2. Verificar o efeito do tratamento crônico com glibenclamida sobre o prejuízo na memória de curto prazo induzido pelo estresse crônico imprevisível;
3. Avaliar o efeito do estresse crônico imprevisível e do tratamento com glibenclamida sobre os receptores de glicocorticoide no córtex pré-frontal e hipocampo;
4. Avaliar o efeito do estresse crônico imprevisível e do tratamento com glibenclamida sobre a ativação microglial no córtex pré-frontal e hipocampo;

5. Avaliar o efeito do estresse crônico imprevisível e do tratamento com glibenclamida no imunocontéudo das proteínas do complexo inflamassoma NLRP3 no córtex pré-frontal e hipocampo;

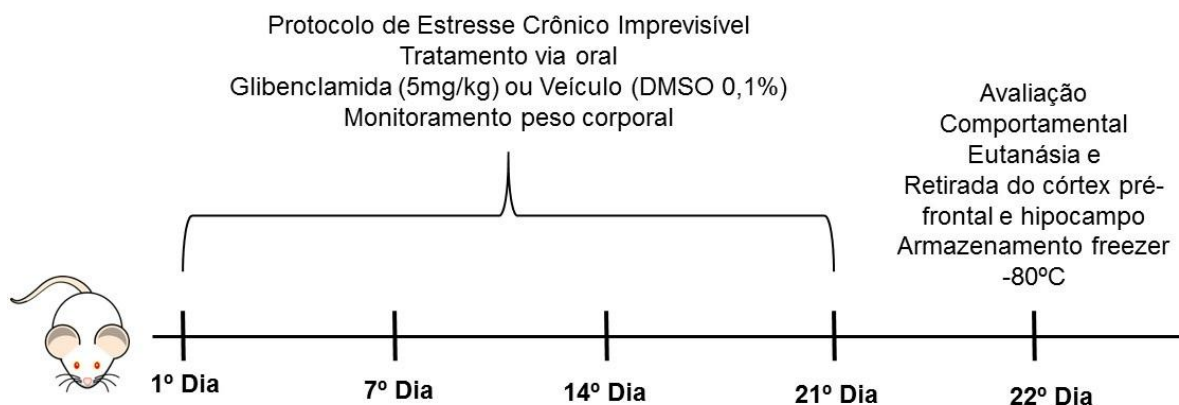
### **3. HIPÓTESE**

O estresse crônico imprevisível é capaz de induzir alterações comportamentais incluindo comportamento tipo-depressivo e prejuízos na memória de curto prazo, juntamente com alterações neuroquímicas associadas à neuroinflamação no córtex pré-frontal e hipocampo. O tratamento crônico com o inibidor da via do inflamassoma NLRP3, glibenclamida, é capaz de prevenir as alterações o efeito do estresse sobre a neuroinflamação, e conseqüentemente, as alterações comportamentais.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. ANIMAIS E TRATAMENTO**

Foram utilizados camundongos fêmeas do tipo *Swiss* com 45-50 dias de idade, obtidos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em caixas de propileno de 30 cm X 20 cm X 13 cm, em grupos de 8 animais por caixa, com um ciclo de 12h de claro/escuro à temperatura de 23 graus, com acesso livre a água e comida (exceto em dias específicos do protocolo de estresse). O experimento foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina (Nº 5021180116). Os animais foram pesados semanalmente, com o tratamento via oral (gavagem), com a aplicação de glibenclamida (5 mg/kg) ou veículo (dimetilsulfóxido, DMSO 0,1%) por 21 dias, iniciando concomitantemente no primeiro dia do protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle + Veículo (animais não-estressados tratados com DMSO 0,1%), Controle + Glib 5 (animais não-estressados tratados com Glibenclamida 5mg/kg, p.o.), ECI + Veículo (animais submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível e tratados com DMSO 0,1%) e ECI + Glib 5 (animais submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível tratados com Glibenclamida 5mg/kg) conforme representado na Figura 3.

**Figura 3. Delineamento do estudo**

**Figura 3.** O protocolo de ECI foi realizado entre o 1º e 21º dia e os camundongos tratados com glibenclamida (5 mg/kg) ou veículo (DMSO 0,1%, p.o.), uma vez ao dia durante todo o protocolo de estresse crônico. O peso corporal foi monitorado durante todo o período de manipulação dos animais. No 21º dia os animais foram retirados do último estressor e 24h após foram submetidos aos testes comportamentais. Imediatamente após os testes comportamentais foi realizada a eutanásia por decapitação, retirada do encéfalo e dissecação do córtex pré-frontal e hipocampo. As estruturas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram guardadas em freezer -80°C até as análises bioquímicas.

#### 4.2. PROTOCOLO

O protocolo de ECI consiste na aplicação aleatória de diferentes estressores moderados por 21 dias consecutivos, conforme Quadro 2, com o intuito de desencadear um comportamento tipo-depressivo nos animais e mimetizar os estressores diários que o ser humano enfrenta (KASTER et al., 2015). A característica imprevisível e aleatória de aplicação dos estressores auxilia na prevenção da adaptação por parte do animal ao estresse. O último estressor consistiu na caixa inclinada 45°, e após 24h foram realizados os testes comportamentais. Imediatamente após o final dos testes comportamentais foi realizada a eutanásia e retirada do encéfalo para dissecação das estruturas encefálicas.

Foram utilizadas 4 cortes de 32 animais cada, sendo realizada na primeira corte os testes comportamentais de suspensão pela cauda, nado forçado e campo aberto. A segunda corte foi utilizada para realizar o teste de realocação de objeto. A terceira corte foi utilizada para as análises de bioquímicas, do protocolo de *western Blot*, enquanto que a quarta corte foi utilizada para realizar as análises através do ELISA.

## Quadro 2. Protocolo de estresse crônico imprevisível

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
<b>Semana 1</b>	Maravalha molhada (24 h)	Pareamento (1 h)	Banho frio (15°C, 20 min)	Estresse de contenção (2h)	Choque inescapável nas patas (0,7 mA – 5 min; aplicados de 1 em 1 min)	Exposição ao aparato de choques sem realização dos choques (5 min)	Maravalha molhada (24 h)
<b>Semana 2</b>	Caixa inclinada (24 h, 45°)	Privação de água e comida (24 h)	Exposição à garrafa de água vazia (1 h)	Inversão de ciclo claro/escuro Caixa de residência sem maravalha (24h)	Pareamento (1h)	Banho frio (15°C, 20 min)	Estresse de contenção (3h)
<b>Semana 3</b>	Choque inescapável nas patas (0,7 mA – 5 min; aplicados de 1 em 1 min)	Exposição ao aparato de choques sem realização dos choques (5min)	Privação de água e comida (24 h)	Exposição à garrafa de água vazia (1 h)	Estresse de contenção (4h)	Inversão de ciclo claro/escuro Caixa de residência sem maravalha (24h)	Caixa inclinada (24 h, 45°)

### 4.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

Foram realizados testes comportamentais para a avaliação das alterações comportamentais induzidas pelo protocolo de ECI, bem como para a verificação do efeito do tratamento com glibenclamida. Os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda e ao teste do nado forçado para avaliação do comportamento tipo-depressivo, ao teste do campo aberto para avaliação da atividade locomotora, e ao teste de realocação de objeto para avaliação da memória de curto prazo.

Alguns cuidados básicos foram utilizados nos testes comportamentais, como aclimatação dos animais na sala de comportamento anteriormente aos testes comportamentais e limpeza dos aparatos com etanol 10% entre cada sessão para eliminar possíveis pistas olfativas. Os animais foram submetidos a eutanásia imediatamente após o último teste comportamental.

#### 4.3.1. Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda é utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo e consiste em aplicar uma situação de estresse inescapável ao animal, onde ele é suspenso do chão e preso pela cauda por uma fita adesiva por 6 minutos (CAN et al., 2012;

STERU et al., 1985). O tempo de imobilidade do animal, considerado como a falta de tentativa de escapar da situação aversiva, é mensurado e utilizado como parâmetro para determinar o comportamento tipo-depressivo (NEIS et al., 2015).

#### 4.3.2. Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é utilizado para verificar o efeito antidepressivo de algum composto ou fármaco (CAN et al., 2012). Os animais são forçados a nadar em um tanque cilíndrico (10 cm de diâmetro x 25 cm de altura) contendo 20 cm de água a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  por 6 minutos (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977). É contabilizado o tempo de imobilidade do animal, sendo mobilidade os movimentos realizados com o intuito de escapar da situação de estresse. Movimentos de equilíbrio e flutuação não são considerados mobilidade (CAN et al., 2012). Um aumento na imobilidade dos animais é considerado como comportamento tipo-depressivo.

#### 4.3.3. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto consiste na avaliação da atividade locomotora dos animais para verificar se o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e no teste do nado forçado é resultado de uma alteração motora (NEIS et al., 2015). O aparato consiste em uma caixa de madeira branca (40 cm x 60 cm x 50 cm), no qual o chão é dividido em 12 quadrantes iguais. O animal é exposto por 6 minutos ao campo aberto e é contado o número de vezes que ele cruza cada quadrante com suas quatro patas. O campo é limpo com álcool 10% entre cada teste.

#### 4.3.4. Teste de realocação de objeto

O teste de realocação de objeto é utilizado para avaliar a memória de curto prazo. O teste consiste em uma sessão de treinamento, na qual os animais são expostos a dois objetos (objeto A e B medindo 6 cm x 3 cm x 7 cm) em uma caixa de madeira (40 cm x 60 cm x 50 cm) durante 5 minutos, e avalia-se o tempo de exploração de cada objeto, para garantir que os animais não possuem preferência pelo objeto A ou B. A sessão de teste ocorre 180 minutos após a sessão de treinamento, na qual os animais são reexpostos a caixa de madeira com o objeto B realocado na posição contrária ao objeto A, por 5 minutos. O tempo de exploração dos objetos A e B foi mensurado e o índice de aprendizagem foi calculado através da fórmula:  $(\text{tempo de exploração do objeto B} \times 100) / (\text{tempo de exploração do objeto B} + \text{tempo de$



exploração do objeto A), sendo esperado um maior tempo de exploração do objeto realocado na sessão de teste, caso contrário, um prejuízo na memória de curto prazo é indicado (YAMADA et al., 2017; CHEN et al., 2016). O aparato é limpo com álcool 10% entre cada sessão do treinamento e teste.

#### 4.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação. O córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecados, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

##### 4.4.1. Western Blot

O *western blot* consiste em uma técnica de separação e imunodeteção de proteínas de interesse em amostras de homogenato de tecido ou frações celulares (TOWBIN, STAHELIN E GORDON, 1979). No presente trabalho as amostras de córtex pré-frontal e hipocampo foram homogeneizadas mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 100 mM, EDTA 2 mM, NaF 200 mM, PMSF 100 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 mM, Triton 100%, Glicerol 50% e coquetel inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados (10.000 g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante dos lisados celulares foram diluídos 1/1 (v/v) em *SDS stop solution* (Tris 500 mM pH 6,8, EDTA 100 mM, SDS 10%) e aquecido a 100°C por 5 min para finalizar a desnaturação de proteínas. Após homogeneização as amostras foram diluídas em *Sample Dilution 25%* (glicerol 100%, TRIS 500 mM e azul de bromofenol, pH 6,8), e β-mercaptoetanol 8%.

A partir da detecção da concentração de proteínas totais nos homogenatos de córtex pré-frontal e hipocampo, 60 µg de proteína foram utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). A separação das proteínas foi feita em um gel com 10% de poliacrilamida e um gel de entrada com 4% de poliacrilamida. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do aparelho *Semy-dry* (1,2 mA/cm<sup>2</sup> por 1h e 30 min). Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com a solução de Ponceau (0,5%) e removidas após visualização das bandas com ácido acético 1% e água ultrapura. Após concluir a etapa de transferência, as membranas foram bloqueadas durante 1h com albumina 5% diluída em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) seguidas de 3 lavagens com TBS-T. O imunoconteúdo de NLRP3, Caspase-1, GR, Iba-1 e β-actina (utilizada como padrão interno) foi identificado através da

incubação com anticorpos primários específicos (anti-NLRP3, feito em coelho, Invitrogen, diluição 1:500; anti-Caspase-1, feito em coelho, Santa Cruz, diluição 1:1000; anti-GR, feito em coelho, Cell Signalling, diluição 1:1000, anti-Iba-1 feito em coelho Cell Signalling, diluição 1:1000 e anti- $\beta$ -actina, feito em coelho, Santa Cruz, diluição 1:1000) diluídos em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05% pH 7,5) contendo albumina de soro bovino 2%. As membranas ficaram incubadas com os anticorpos primários *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente com anticorpos secundários anti-coelho conjugados com peroxidase (Santa Cruz, 1:5000). A imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente ECL (GE Healthcare©) no equipamento fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad©). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando o software ImageLab (Bio-Rad©). O imunoconteúdo das proteínas-alvo e padrão foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas/DO da  $\beta$ -actina. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%) (LEAL et al., 2002; LEAL et al., 2007; NEIS et al., 2017).

#### 4.4.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é baseado na detecção de antígenos marcados por anticorpos específicos, os quais estão ligados à uma enzima, que quando na presença do seu substrato gera uma alteração colorimétrica que pode ser detectada pelo espectrofotômetro (GAN e PATEL, 2013). O córtex pré-frontal e o hipocampo foram homogeneizados em tampão (Tris 50mM, EDTA 1 mM, Fluoreto de sódio 100mM, fluoreto de fenilmetano sulfonil 0,1 mM, Ortovanadato 2mm, Triton 1% e Glicerol 10%), centrifugados (10.000g por 10 min a 4°C) e o sobrenadante foi coletado. Os níveis de IL-1 $\beta$  foram medidos usando kits de imunoenensaio específicos (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Mouse IL-1 $\beta$  uncoated ELISA Kit). A placa foi incubada com 100  $\mu$ l de anticorpo de captura durante a noite. No dia seguinte a placa contendo o anticorpo de captura foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem (PBS 1x, 0,05% Tween 20, pH 7,4) e posteriormente bloqueado durante 1h utilizando 200  $\mu$ l por poço do diluente ELISA/ELISPOT 1x. O padrão de IL-1 $\beta$  foi reconstituído em água destilada e a curva foi feita por uma diluição seriada sendo o ponto mais alto 1.000 pg/ml. Após o bloqueio, a placa foi lavada com tampão de lavagem 3 vezes e as amostras e a curva padrão foram pipetadas (100  $\mu$ l por poço). Após a pipetagem das amostras e da curva, a placa foi selada e incubada à temperatura ambiente por 2h. Depois desta incubação, a placa foi lavada 3

vezes com tampão de lavagem e incubada à temperatura ambiente por 1h com o anticorpo de detecção. Lavou-se a placa novamente com tampão de lavagem e adicionou-se a enzima peroxidase de rabanete (100 µl por poço) por 30 minutos. Após este período a placa foi lavada com tampão de lavagem por 5 vezes e adicionou-se 100 µl de TMB solution 1x por poço, o qual ficou incubando por 15 minutos. Ao final, a reação foi parada utilizando 50 µl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a placa foi lida em um espectrofotômetro à 450 nm, através do equipamento leitor de absorvância Tecan's Infinite®. Os valores foram expressos em pg/mL.

#### 4.4.4. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais foi quantificada através do método de Peterson (1977), adaptado do método de Lowry, na qual as cadeias laterais das proteínas reagem com o composto de folin-fenol gerando uma solução cujo a concentração é determinada através da absorvância pelo espectrofotômetro. As amostras de córtex pré-frontal e hipocampo foram homogeneizadas mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 100 mM, EDTA 2 mM, NaF 200 mM, PMSF 100 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 mM, Triton 100%, Glicerol 50% e coquetel inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados (10.000 g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante dos lisados celulares foi diluído 1/1 (v/v) em *SDS stop solution* (Tris 500 mM pH 6,8, EDTA 100 mM, SDS 10%) e aquecido a 100°C por 5 min para finalizar a desnaturação de proteínas. Após homogeneização uma alíquota de 20 µL foi retirada para realizar a dosagem de proteínas. Foi utilizada a albumina de soro bovino como padrão e a mensuração da absorvância foi realizada em 620 nm, através do equipamento leitor de absorvância Tecan's Infinite®.

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados utilizando os *softwares* GraphPad Prism 7® e Statistica 7®, em conjunto com o GraphPad QuickCalcs® para eliminação de valores *outliers* dentro dos grupos. A avaliação da distribuição normal dos dados entre os grupos foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas foram avaliadas usando o Teste t de *Student* para a fase de treino do teste de realocação de objeto, ANOVA de duas vias para os testes comportamentais de suspensão pela cauda, nado forçado, campo aberto e realocação de objeto, *Western blot* e ELISA, seguido pelo *post-hoc* de Turkey quando apropriado. Os resultados obtidos dos testes comportamentais foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) e os resultados obtidos das análises por *Western Blot* foram expressos como

porcentagem da média do controle  $\pm$  E.P.M. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL E PELO TRATAMENTO COM GLIBENCLAMIDA

#### 5.1.1. Comportamento tipo-depressivo

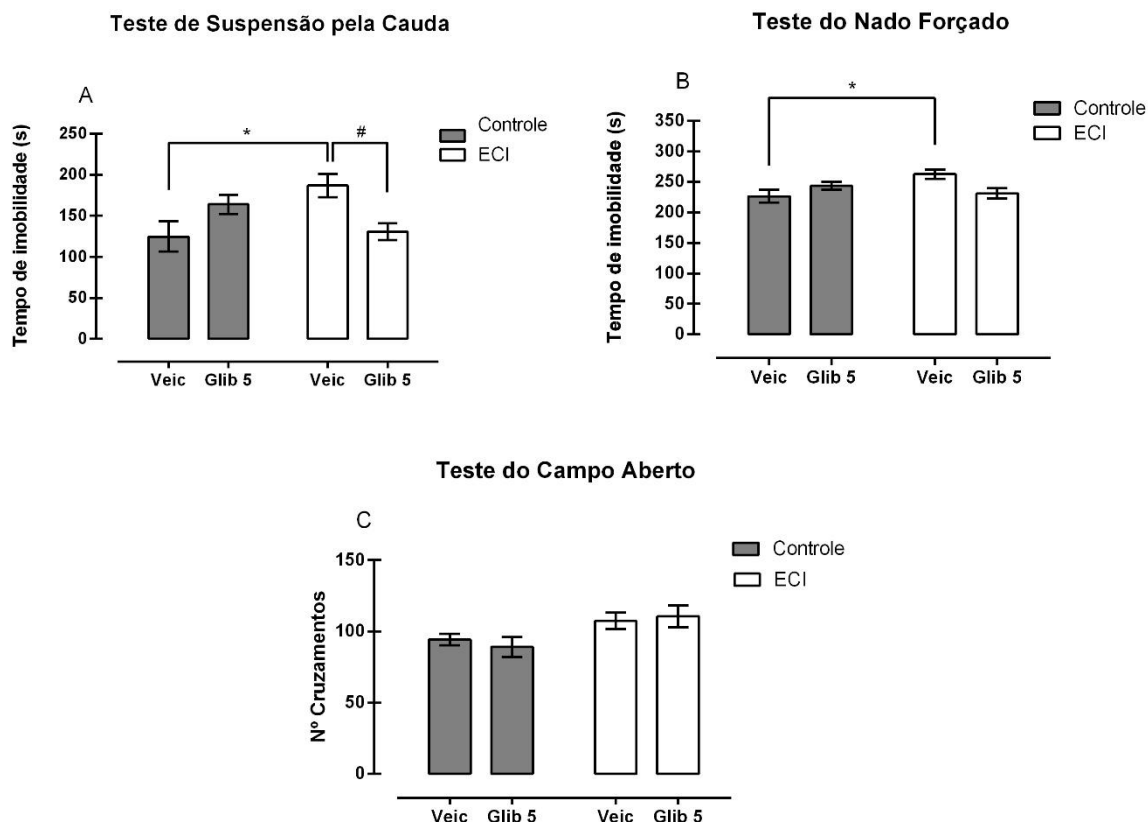
Conforme ilustrado na Figura 4A, os animais expostos ao protocolo de ECI apresentaram um aumento do tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo controle no teste de suspensão pela cauda. A ANOVA de duas vias não demonstrou um efeito do ECI [ $F(1, 34) = 1,134, P = 0,2942$ ] ou do tratamento [ $F(1, 34) = 0,3918, P = 0,5354$ ], mas demonstrou um efeito significativo da interação entre estresse e tratamento [ $F(1, 34) = 12,58, P = 0,0011$ ]. A análise de *post-hoc* revelou que o grupo submetido ao ECI tratado com veículo apresentou um tempo de imobilidade maior em relação ao grupo controle tratado com veículo ( $p < 0,05$ ), um indicativo de efeito tipo-depressivo. Por outro lado, o grupo submetido ao ECI e tratado com glibenclamida 5mg/kg apresentou uma redução no tempo de imobilidade em relação ao grupo ECI tratado com veículo ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a glibenclamida é capaz de prevenir o efeito do ECI no teste de suspensão pela cauda.

A Figura 4B demonstra que o grupo ECI apresentou um aumento do tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle no teste do nado forçado. A ANOVA de duas vias não demonstrou resultados significativos do ECI [ $F(1, 34) = 1,891, P = 0,1781$ ] ou do tratamento [ $F(1, 34) = 0,7261, P = 0,4001$ ], entretanto foi demonstrado uma interação significativa entre ECI e tratamento [ $F(1, 34) = 7,885, P = 0,0082$ ]. A análise de *post-hoc* revelou que o grupo ECI tratado com veículo teve um aumento no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle tratado com veículo ( $p < 0,05$ ), indicando um comportamento tipo-depressivo. Contudo, o grupo submetido ao ECI e tratado com glibenclamida 5mg/kg não foi significativamente diferente do grupo controle tratado com veículo ou do grupo ECI tratado com veículo ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a glibenclamida é capaz de prevenir parcialmente o efeito do ECI no teste do nado forçado.

A Figura 4C ilustra os resultados do teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para ECI [ $F(1, 34) = 7,075, P = 0,0116$ ], entretanto nenhum efeito para tratamento com glibenclamida [ $F(1, 34) = 0,02454, P = 0,8764$ ] ou interação entre

ECI e tratamento [F (1, 34) = 0,4163, P = 0,5229]. A análise de *post-hoc* não indicou diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que nem o ECI e nem o tratamento com glibenclamida causam alterações na locomoção espontânea.

**Figura 4. Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida no comportamento tipo-depressivo e locomoção espontânea.**



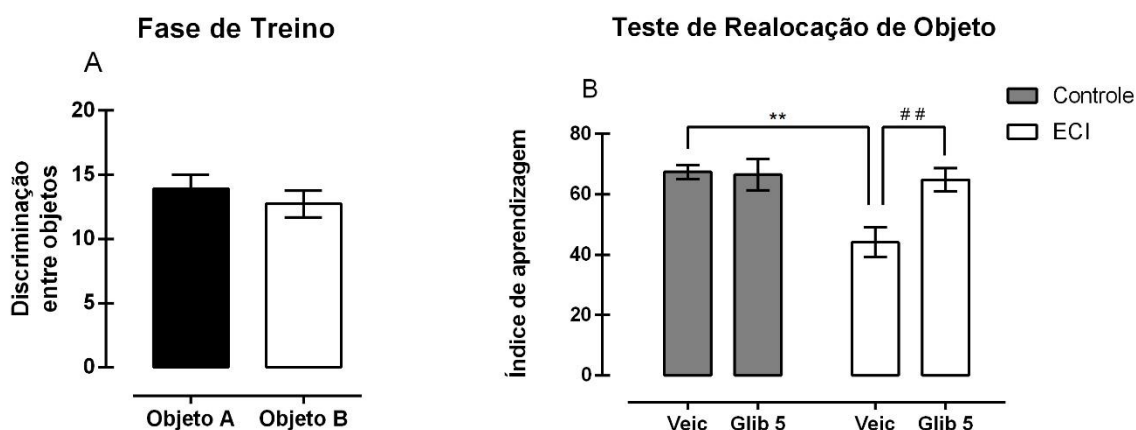
**Figura 4.** Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg, p.o.) no comportamento tipo-depressivo mensurado pelo tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (A) e no teste do nado forçado (B), e na locomoção espontânea mensurado pelo número de cruzamentos no teste do campo aberto (C). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (A) \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo controle ECI + veículo. #  $p < 0.05$  comparado ao grupo ECI + Glib 5. Abreviações: ECI - estresse crônico imprevisível, Glib 5: glibenclamida 5mg/kg, Veic – veículo. N = 8 por grupo.

### 5.1.2. Memória de curto prazo

Os resultados da Figura 5 demonstram o efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida sobre a memória de curto prazo avaliada no teste de realocação de objetos. A figura 5A ilustra o tempo de exploração entre os objetos A e B no período de treinamento do teste de realocação de objeto. No teste t não foi observada diferença entre os objetos [ $t = 0,8106$   $df = 78$ ,  $p = 0,4201$ ], sugerindo que os animais não apresentaram preferência por um dos objetos.

A Figura 5B demonstra os resultados do período de teste, 180 minutos após o período de treinamento. A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo do ECI [ $F(1, 35) = 8,617, P = 0,0058$ ], para o tratamento com glibenclamida [ $F(1, 35) = 5,396, P = 0,0261$ ] e para a interação entre ECI e tratamento [ $F(1, 35) = 6,426, P = 0,0159$ ] no índice de aprendizagem dos animais. Foi observada, através da análise de *post-hoc*, uma diminuição no índice de aprendizagem do grupo ECI tratado com veículo comparado ao grupo controle tratado com veículo ( $p < 0,01$ ), sugerindo um prejuízo na memória de curto prazo. O grupo ECI tratado com glibenclamida obteve um aumento no índice de aprendizagem quando comparado ao grupo ECI tratado com veículo ( $p < 0,01$ ), demonstrando que a glibenclamida é capaz de prevenir o efeito do ECI na memória de curto prazo.

**Figura 5. Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida na memória de curto prazo**



**Figura 5.** Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg) na memória de curto prazo, avaliado pelo tempo de exploração dos objetos A e B na fase de treinamento (A), e através do índice de aprendizagem mensurado pelo tempo de exploração do objeto realocado em relação ao objeto fixo (B). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (A) \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo controle + veículo. ##  $p < 0,01$  comparado ao grupo ECI + glib 5. Abreviações: ECI - estresse crônico imprevisível, Glib 5: glibenclamida 5mg/kg, Veic - veículo. N = 8 por grupo.

## 5.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM GLIBENCLAMIDA SOBRE AS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO IMREVISIVEL

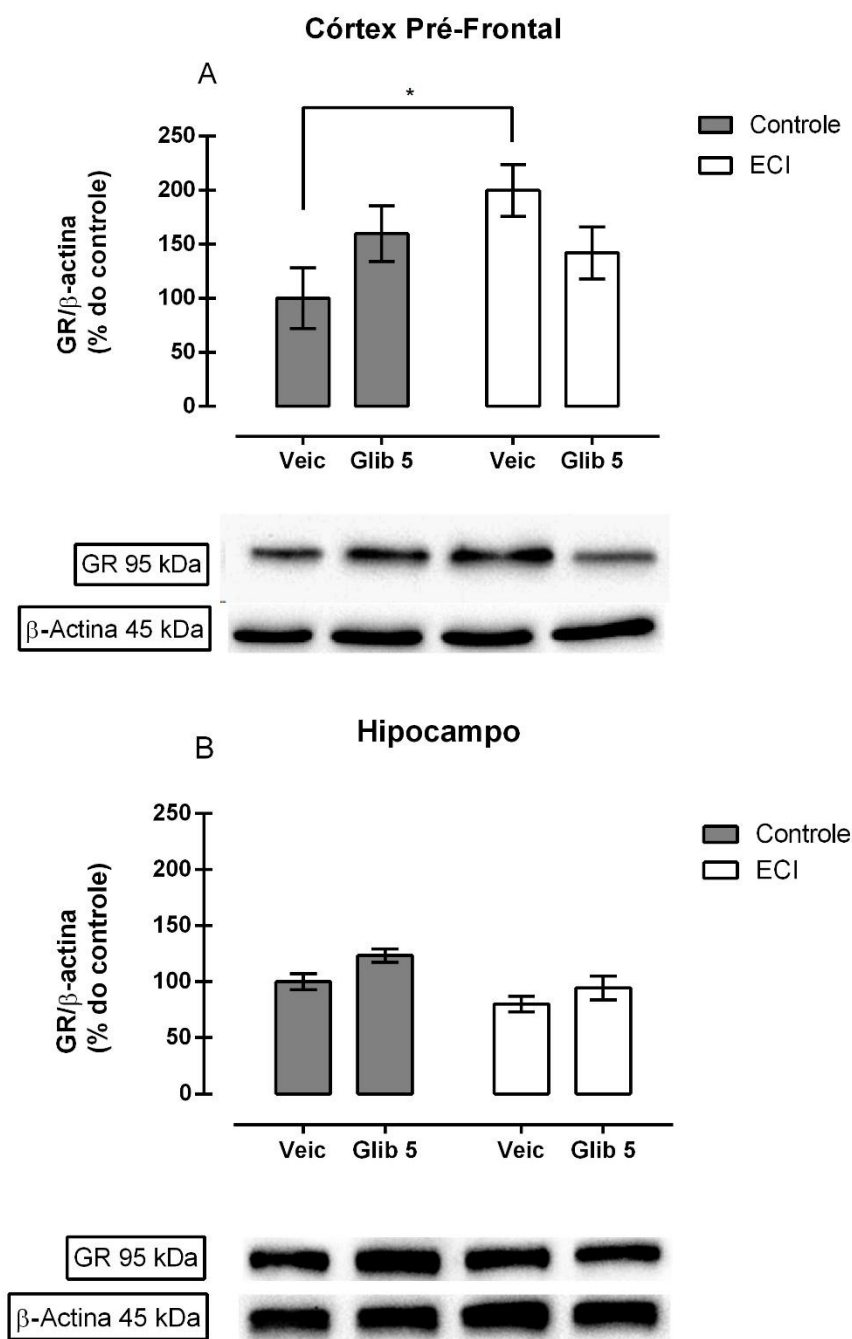
### 5.2.1. Níveis de Receptores de glicocorticóides

Os resultados apresentados pela Figura 6A ilustram o efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg) sobre a imunoreatividade dos receptores de glicocorticóides no córtex pré-frontal. A ANOVA de duas vias não demonstrou um efeito significativo do ECI [ $F(1, 27)$ ]

= 2,544,  $P = 0,1223$ ], ou para o tratamento com glibenclamida [ $F(1, 27) = 0,001457$ ,  $P = 0,9698$ ], porém foi observado um efeito significativo da interação entre o ECI e o tratamento [ $F(1, 27) = 5,226$ ,  $P = 0,0303$ ] nas amostras de córtex pré-frontal. A análise *post-hoc* revelou que o grupo ECI tratado com veículo apresentou um aumento nos níveis de receptores de glicocorticóides em relação ao grupo controle tratado com veículo no córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ). Contudo, o grupo submetido ao ECI e tratado com glibenclamida 5mg/kg não foi significativamente diferente do grupo controle tratado com veículo, ou do grupo ECI tratado com veículo ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a glibenclamida é capaz de prevenir parcialmente o efeito do ECI sobre os níveis dos receptores de glicocorticóides no córtex pré-frontal.

Os resultados apresentados pela Figura 6B ilustram o efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg) sobre a imunoreatividade dos receptores de glicocorticóides no hipocampo. A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo para o ECI [ $F(1, 28) = 9,369$ ,  $P = 0,0048$ ] e para o tratamento com glibenclamida [ $F(1, 28) = 5,665$ ,  $P = 0,0243$ ] mas não demonstrou efeito significativo para a interação do ECI com o tratamento [ $F(1, 28) = 0,3269$ ,  $P = 0,5720$ ].

**Figura 6. Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida nos níveis de receptores de glicocorticoides**



**Figura 6.** Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg) no imunocnteuído de receptores de glicocorticóides avaliados em homogenato total de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B). A densidade das bandas foi avaliada e os valores foram calculados como uma razão entre a proteína de interesse GR e a  $\beta$ -actina, usada como controle interno do nível proteico. Os valores em porcentagem da média do controle estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle + veículo. Abreviações: ECI - estresse crônico imprevisível, Glib 5- glibenclamida 5mg/kg, GR - receptores de glicocorticoides, Veic - veículo DMSO 0,1%. N = 8 por grupo.



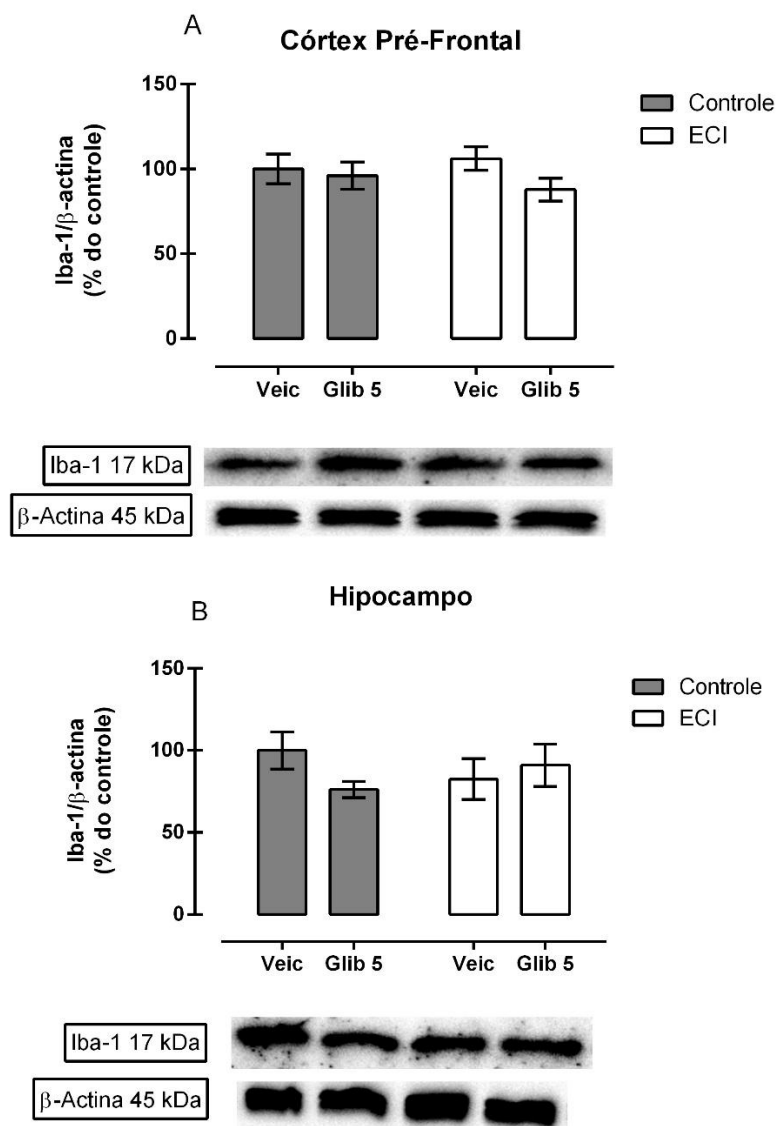
### 5.3. EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISIVEL E TRATAMENTO COM GLIBENCLAMIDA SOBRE ALTERAÇÕES NEUROINFLAMATÓRIAS

#### 5.3.1 Níveis da proteína microglial Iba-1

A Figura 7A ilustra os níveis de Iba-1 no córtex pré-frontal de animais submetidos ao ECI e tratados com glibenclamida. A ANOVA de duas vias não apontou valores significativos para o ECI [ $F(1, 27) = 0,02046$ ,  $P = 0,8873$ ], para o tratamento [ $F(1, 27) = 2,048$ ,  $P = 0,1639$ ] ou para a interação do ECI com o tratamento [ $F(1, 27) = 0,8578$ ,  $P = 0,3626$ ].

A Figura 7B ilustra os níveis de Iba-1 no hipocampo de animais submetidos ao ECI e tratados com glibenclamida. A ANOVA de duas vias não apontou valores significativos para o ECI [ $F(1, 27) = 0,01374$ ,  $P = 0,9076$ ], para o tratamento [ $F(1, 27) = 0,4640$ ,  $P = 0,5015$ ] ou para a interação do ECI com o tratamento [ $F(1, 27) = 2,086$ ,  $P = 0,1601$ ].

**Figura 7. Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida nos níveis de Iba-1**



**Figura 7.** Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg) no imunoconteúdo de Iba-1 no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B). O imunoconteúdo foi corrigido a partir da razão da banda caspase-1 clivada em relação a pró-caspase-1 total. A densidade das bandas foi avaliada e os valores foram calculados como uma razão entre a proteína de interesse iba-1 e a β-actina, usada como controle interno do nível proteico. Os valores em porcentagem da média do controle estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Abreviações: ECI - estresse crônico imprevisível, Glib 5- glibenclamida 5mg/kg, Iba-1 - adaptador molecular de ligação a cálcio ionizado, Veic – veículo. N = 8 por grupo.

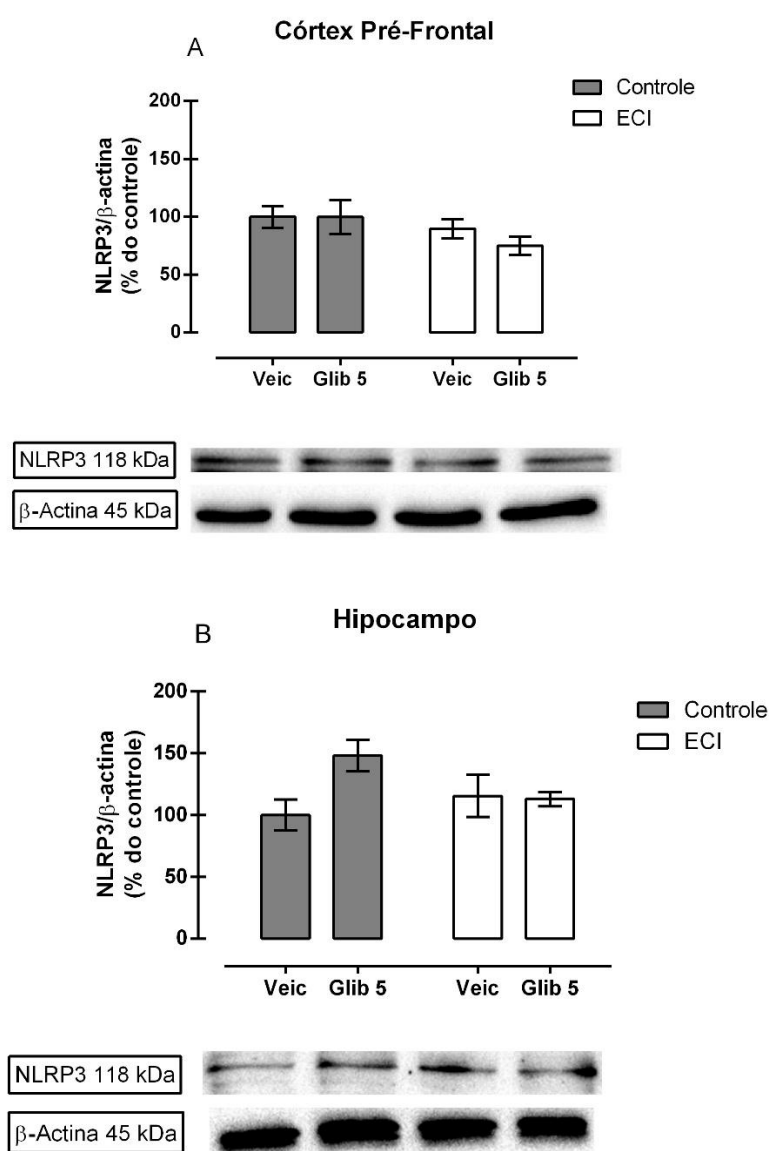
### 5.3.2. Níveis da proteína NLRP3

A Figura 8A demonstra o efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida (5mg/kg) sobre os níveis de NLRP3, a principal proteína que compõe o inflammasoma NLRP3, no homogenato total de córtex pré-frontal. A ANOVA de duas vias não demonstrou nenhum efeito significativo para o ECI [ $F(1, 25) = 2,841, P = 0,1044$ ], para o tratamento com glibenclamida

[F (1, 25) = 0,5296, P = 0,4735] ou para a interação entre o ECI com o tratamento [F (1, 25) = 0,4803, P = 0,4947].

A Figura 8B demonstra o efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida (5mg/kg) sobre os níveis de NLRP3, no homogenato total de hipocampo. A ANOVA de duas vias não demonstrou nenhum efeito significativo para o ECI [F (1, 27) = 0,5597, P = 0,4608] para o tratamento com glibenclamida [F (1, 27) = 3,040, P = 0,0926] ou para a interação entre o ECI com o tratamento [F (1, 27) = 3,760, P = 0,0630].

**Figura 8. Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida nos níveis de NLRP3**



**Figura 8.** Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg) no imunocnteuído da proteína NLRP3 em homogenato total de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B). A densidade das bandas foi avaliada e os valores foram calculados como uma razão entre a proteína de interesse NLRP3 e a β-actina, usada como controle interno do nível proteico. Os valores em porcentagem da média do controle

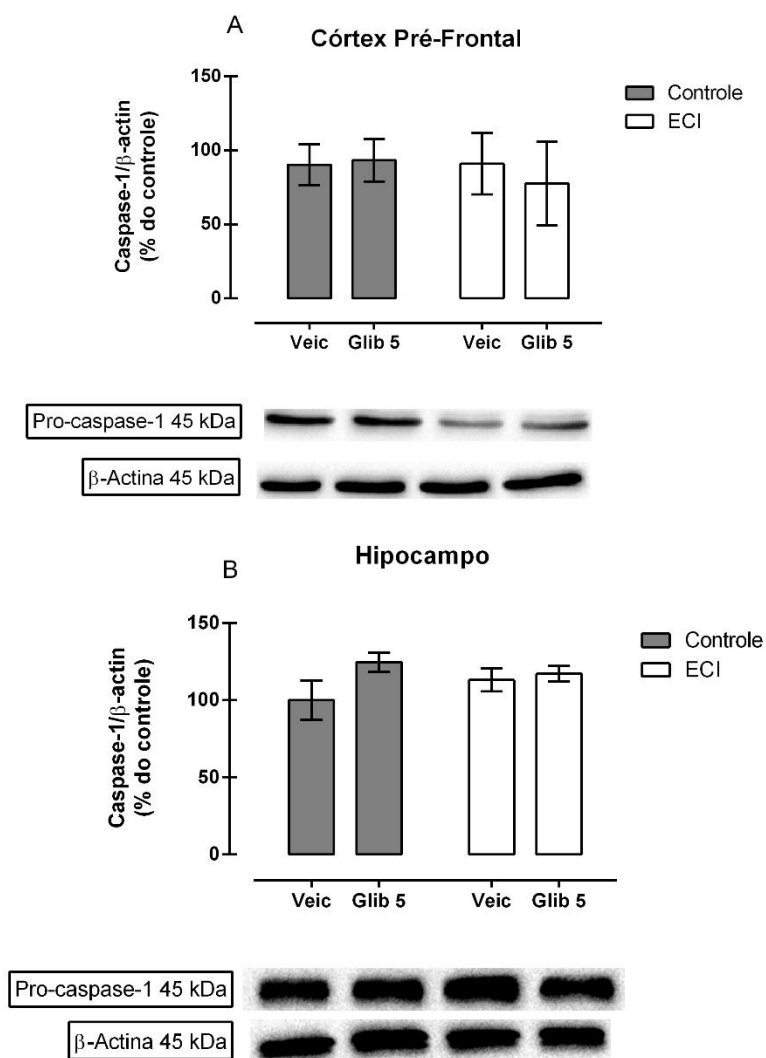
estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Abreviações: ECI - estresse crônico imprevisível, Glib 5- glibenclamida 5mg/kg, Veic – veículo DMSO 0,1%. N = 8 por grupo.

### 5.3.3. Níveis da proteína caspase-1 total

A Figura 9A representa o efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida (5mg/kg) sobre os níveis totais da proteína caspase-1 no córtex pré-frontal. A ANOVA de duas vias não demonstrou valores significativos para o ECI [ $F(1, 25) = 0,3803$ ,  $P = 0,5430$ ], para o tratamento [ $F(1, 25) = 0,1812$ ,  $P = 0,6740$ ] ou para interação entre ECI e tratamento [ $F(1, 25) = 0,4469$ ,  $P = 0,5100$ ].

A Figura 9B representa o efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida (5mg/kg) sobre os níveis totais da proteína caspase-1 no hipocampo. A ANOVA de duas vias não apontou valores significativos para o ECI [ $F(1, 28) = 0,1172$ ,  $P = 0,7347$ ] para o tratamento [ $F(1, 28) = 2,902$ ,  $P = 0,0995$ ] ou para interação entre ECI e tratamento [ $F(1, 28) = 1,495$ ,  $P = 0,2316$ ].

**Figura 9. Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida nos níveis de caspase-1 total**



**Figura 9.** Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5mg/kg) no imunoconteúdo de caspase-1 total no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B). A densidade das bandas foi avaliada e os valores foram calculados como uma razão entre a proteína de interesse caspase-1 total e a  $\beta$ -actina, usada como controle interno do nível proteico. Os valores em porcentagem da média do controle estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Abreviações: ECI - estresse crônico imprevisível, Glib 5- glibenclamida 5mg/kg, Veic – veículo. N = 8 por grupo.

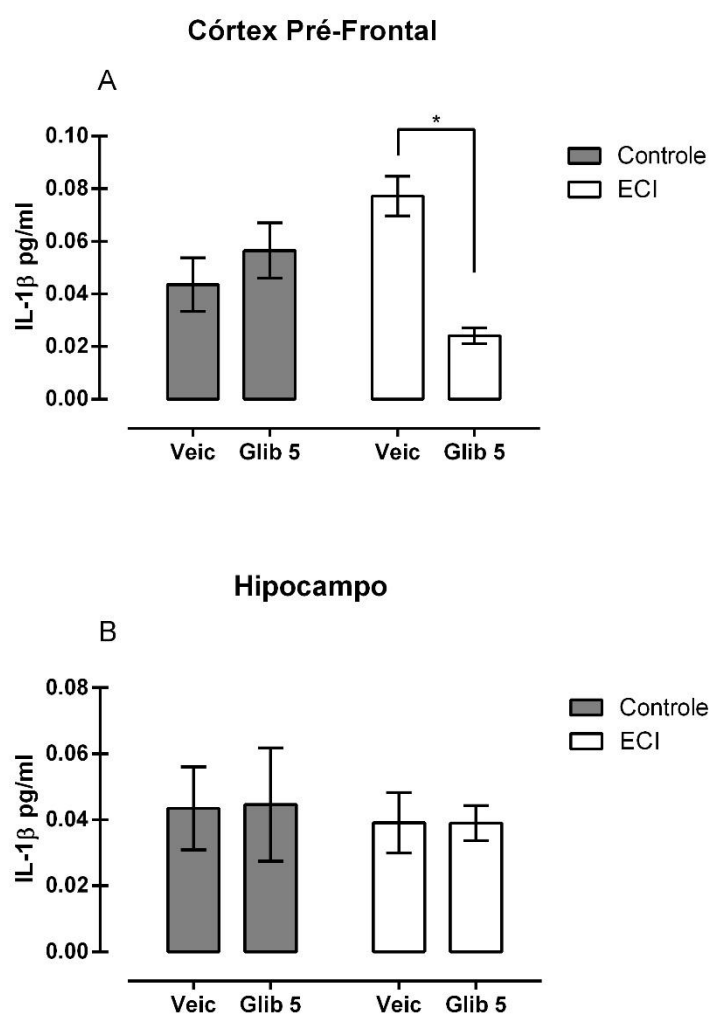
### 5.3.3 Níveis de IL-1 $\beta$

A Figura 10A ilustra os níveis de IL-1 $\beta$ , principal citocina produzida em resposta à ativação do complexo do inflamassoma NLRP3, em homogenato total de córtex pré-frontal de animais submetidos ao ECI e tratados com glibenclamida (5mg/kg) por 21 dias. A ANOVA de duas vias não demonstrou resultados significativos para o ECI [F (1, 10) = 0,003798, P = 0,9521] ou para o tratamento com glibenclamida [F (1, 10) = 4,071, P = 0,0712], entretanto

existe um efeito significativo para a interação entre ECI e tratamento [ $F(1, 10) = 11,05$ ,  $P = 0,0077$ ]. A análise de *post-hoc* evidenciou uma diferença significativa entre o grupo ECI tratado com veículo e o grupo ECI tratado com glibenclamida (5 mg/kg) ( $p < 0,05$ ), sugerindo que o tratamento com glibenclamida reduz os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal em animais submetidos ao ECI.

A Figura 10B ilustra os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo de animais submetidos ao ECI e tratados com glibenclamida. A ANOVA de duas vias não demonstrou resultados significativos para o ECI [ $F(1, 16) = 0,1869$ ,  $P = 0,6713$ ], para o tratamento com glibenclamida [ $F(1, 16) = 0,002194$ ,  $P = 0,9632$ ] ou para a interação do ECI com o tratamento [ $F(1, 16) = 0,003210$ ,  $P = 0,9555$ ].

**Figura 10. Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida nos níveis de IL-1 $\beta$**



**Figura 10.** Efeito do ECI e tratamento com glibenclamida (5 mg/kg) nos níveis de IL-1 $\beta$  em homogenato total de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B). Os valores estão expressos em pg/mL, como média  $\pm$  erro padrão da média \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo ECI tratado com veículo.

Abreviações: ECI - estresse crônico imprevisível, Glib 5- glibenclamida 5mg/kg, Veic – veículo. N = 8 por grupo.

## 6. DISCUSSÃO

O estresse crônico imprevisível é um modelo animal amplamente aceito para o estudo de aspectos psiquiátricos que causam modificações comportamentais e neuroquímicas, simulando e mimetizando as condições enfrentadas por seres humanos em ambientes e situações de psicopatologias, como o TDM (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; WILLNER, 2017; WILLNER, 1984; WILLNER e BELZUNG, 2015). Este modelo de estresse submete os animais a uma variedade de diferentes estressores imprevisíveis de forma diária, que resulta em modificações comportamentais e neurobiológicas associadas a um humor deprimido e diminuição de prazer e recompensa (WILLNER, 2016; HILL et al., 2012). No presente estudo demonstramos que a aplicação do protocolo de ECI é capaz de produzir um comportamento tipo-depressivo nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado, e um prejuízo na memória de curto prazo no teste de realocação de objeto. Estas alterações comportamentais foram correlacionadas com as modificações neuroquímicas no córtex pré-frontal, como aumento nos receptores de glicocorticoides. As modificações comportamentais causadas pelo protocolo de ECI foram reduzidas ou prevenidas a partir do tratamento crônico de 21 dias com glibenclamida, juntamente com a normalização dos níveis de receptores de GC. Além disso, o tratamento com glibenclamida reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal nos animais submetidos ao ECI.

Com relação ao comportamento tipo-depressivo nossos resultados corroboram com a literatura, ilustrando que o estresse crônico produz um comportamento tipo-depressivo nos animais pelos testes de suspensão pela cauda e teste do nado forçado (OZKARTAL et al., 2019; MOREAU et al., 1995; D'AQUILA, BRAIN e WILLNER, 1994). Um maior tempo de imobilidade está associado a um comportamento tipo-depressivo e o tratamento com fármacos antidepressivos está relacionado com a diminuição deste tempo de imobilidade, produzindo um efeito tipo-antidepressivo (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977; CAMARGO et al., 2019; DULAWA e HEN, 2005; FREITAS, NEIS e RODRIGUES, 2016; FREITAS et al., 2014; MORETTI et al., 2015; NEIS et al., 2014; NEIS et al., 2016; NEIS et al., 2016; NEIS et al., 2018).

No presente estudo, o tratamento crônico por 21 dias com glibenclamida não proporcionou uma diminuição no tempo de imobilidade *per se* nos animais controle, porém

nos animais submetidos ao ECI, preveniu o aumento do tempo de imobilidade induzido pelo ECI, corroborando estudos prévios que demonstram a ação tipo-antidepressiva deste composto em modelos animais (SU et al., 2017; ESMAEILI, BAHARI e SALARI, 2018). Kaster et al. (2007) demonstraram que a administração aguda intracerebroventricular de glibenclamida (5 µl/animal) produziu um efeito tipo antidepressivo no TNF. O tratamento por 12 semanas com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) preveniu o efeito tipo depressivo e anedônico em um modelo de estresse de 12 semanas (SU et al., 2017). Além disso, o tratamento com glibenclamida (6 mg/kg, p.o.) por 20 dias preveniu o comportamento tipo-depressivo e ansioso em um modelo de injeção de peptídeo Aβ (ESMAEILI, BAHARI e SALARI, 2018). A glibenclamida é um agente hipoglicemiante utilizado no tratamento de *Diabetes Mellitus* tipo 2 e foi demonstrada como um inibidor da via do inflamassoma NLRP3 (LAMKANFI et al., 2009). A inibição de componentes da via do inflamassoma NLRP3 está associada com a melhora do comportamento tipo-depressivo em testes preditivos (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2017; LI et al., 2017; KAUFMANN et al., 2017; ZHANG et al., 2019; FU et al., 2019; GENG et al., 2019).

Nossos resultados também demonstraram que o protocolo de ECI induz um prejuízo na memória espacial de curto prazo, ao diminuir o índice de aprendizagem referente ao objeto realocado no teste de realocação de objeto. Estudos prévios demonstraram que o protocolo de ECI causa um prejuízo na memória espacial em modelos animais. Costa et al. (2019) demonstraram que o protocolo de ECI por 3 semanas foi capaz de provocar um prejuízo na memória espacial de ratos machos através do teste do labirinto em Y. A aplicação do ECI por 5 semanas também demonstrou causar um prejuízo na memória espacial avaliado pelo teste do labirinto aquático de Morris (SHEN et al., 2019). Além disso, o protocolo de ECI por 35 dias, aplicados em camundongos machos C57/BL/6, também induziu prejuízos na memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris (CHAI et al., 2018).

No presente estudo, o tratamento com glibenclamida foi capaz de prevenir o prejuízo na memória dos animais submetidos ao ECI, entretanto não produz uma melhoria na memória de curto prazo dos animais controle. Gainey et al. (2016) demonstraram que a aplicação de glibenclamida (6,6 mg/kg, i.p.) foi capaz de melhorar o prejuízo de memória de ratos submetidos a uma dieta rica em gordura, através dos testes de realocação de objeto e reconhecimento de objeto. Chen et al. (2016) demonstraram que a administração de glibenclamida (10 mg/kg, p.o.) foi capaz de prevenir prejuízos na memória espacial de camundongos diabéticos através dos testes do labirinto aquático de Morris e labirinto em Y. Esmaili et al. (2019) também demonstraram que o tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, p.o.) por 21 dias melhorou o prejuízo de memória e aprendizado induzido por um modelo de



diabetes tipo 2 e Doença de Alzheimer esporádica em ratos machos, avaliados no teste do labirinto aquático de Morris e labirinto em Y. O pré-tratamento com glibenclamida por 7 dias (10 µg/kg, i.p.) também demonstrou melhorar o prejuízo de memória induzido por traumatismo crânio-encefálico em ratos, avaliados no labirinto aquático de Morris (STOKUM et al., 2017).

A seguir avaliamos as alterações neuroquímicas associadas ao ECI que poderiam ser um alvo do tratamento com glibenclamida. Nosso foco foi no córtex pré-frontal e no hipocampo devido a relação do estresse com a redução da neuroplasticidade destas áreas. Foi demonstrado que o estresse crônico influencia na circuitaria neuronal, reduzindo as conexões, funções e densidades sinápticas e dendríticas, com perdas de espinhos dendríticos, causando uma atrofia destas regiões e uma diminuição dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e alterações funcionais na LTP e LTD (MAGARIÑOS e MCEWEN, 1995; LIU e AGHAJANIAN, 2008; DUMAN et al., 2016; MCEWEN et al., 2015).

Nossos resultados demonstraram que o ECI causou um aumento na densidade de receptores de GC em extratos totais de córtex pré-frontal, sem causar alterações no hipocampo, diferindo em parte da literatura. Os GRs são proteínas citosólicas que interagem com os GCs produzidos em decorrências de estímulos estressantes. A interação GR/GC transloca o receptor para o núcleo, onde este modula a transcrição de genes envolvidos na ativação do metabolismo, regulação do sistema imunológico e do eixo HPA. Os efeitos da ativação dos GRs regulam a atividade prolongada do eixo HPA juntamente com uma retroinibição de sua produção em regiões como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (BATH, SCHILIT e LEE, 2013). Hu et al. (2016) demonstraram que a administração crônica do glicocorticoide sintético dexametasona (5 mg/kg, s.c.) por 7, 14, 21 e 28 dias diminui a expressão e densidade proteica de GR no córtex pré-frontal e hipocampo. Contudo, não podemos descartar que possa estar ocorrendo uma alteração na densidade de GR nas frações citosólica e nucleares, pois nossos resultados indicam a densidade total dos GR, não especificando a localização subcelular, o que poderia induzir melhor seu estado de ativação. Além disso, neste estudo não foi verificado outros marcadores do eixo HPA, como corticosterona, ACTH e CRH, limitando nossa análise sobre as influências do ECI sobre alterações neste eixo.

O tratamento com glibenclamida (5 mg/kg) não modificou os níveis de receptores de glicocorticoides no córtex pré-frontal ou hipocampo dos animais controle ou submetidos ao ECI. Entretanto a glibenclamida foi capaz de reduzir parcialmente os níveis de GC no córtex pré-frontal de animais submetidos ao estresse. De acordo com Su et al. (2017) o tratamento crônico de 12 semanas com glibenclamida (10 mg/kg i.p.) normalizou as alterações de corticosterona derivadas do eixo HPA induzidas pelo ECI de 12 semanas em camundongos

machos. Além disso, Esmaeili et al. (2018) demonstraram que o tratamento com glibenclamida (6 mg/kg) por 20 dias reverteu as alterações no eixo HPA, através dos níveis de corticosterona, induzidos pelo peptídeo A $\beta$  25-35 (10  $\mu$ g/5  $\mu$ l/animal i.c.v.). Assim, nossos resultados reforçam o efeito do tratamento crônico com glibenclamida sobre a normalização do eixo HPA em situações de estresse, contudo, o alvo molecular ainda precisa ser esclarecido.

Estudos têm demonstrado o envolvimento de vias neuroinflamatórias associadas com o desenvolvimento do TDM (ALCOCER-GÓMEZ e CORDERO, 2014; IWATA et al., 2013; SINGHAL et al., 2014). No presente trabalho avaliamos a proteína microglial Iba-1, como um parâmetro geral de neuroinflamação. A micróglia exerce um papel importante na defesa e reparo do SNC, respondendo a danos ou doenças através de sua ativação, que aumentam sua proliferação, migração, liberação de citocinas e fagocitose (KREUTZBERG, 1996; RAIVICH et al., 1999). A proteína Iba-1 é expressa exclusivamente em macrófagos e micróglia, e é responsável pela alteração do fenótipo de repouso para sua forma ativa e fagocítica, através da associação com filamentos de actina do citoesqueleto. Em um estado microglial ativado, a expressão de Iba-1 está aumentada (IMAI et al., 1996; OHSAWA et al., 2000; ITO et al., 1998; OHSAWA et al., 2004). Pan et al. (2014) demonstraram que o ECI de 12 semanas eleva os níveis de Iba-1 no córtex pré-frontal de ratos machos. Feng et al. (2019) demonstraram que o estresse crônico de contenção de 6h por 21 dias aumentou os níveis de Iba-1 no hipocampo de ratos machos. No nosso estudo não observamos alterações nos níveis de Iba-1 após ECI e/ou tratamento com glibenclamida no córtex pré-frontal e hipocampo. Contudo, não podemos descartar a ocorrência de alterações mais sutis na morfologia microglial, que seriam melhor avaliadas pelo uso de técnicas de imunohistoquímica.

A via do inflamassoma NLRP3 é amplamente estudada e relacionada com o aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com TDM (LICINIO e WONG, 1999; CONNOR e LEONARD, 1998; DOWLATI et al. 2010; SCHIEPERS, WICHERS e MAES, 2004; MILLER, MALETIC e RAISON, 2009; YIRMIYA, RIMMERMAN e RESHEF, 2015; FELGER e LOTRICH, 2013; RAEDLER, 2011; WALKER et al., 2014). Esta via é expressa no SNC, principalmente na micróglia, e relaciona o estresse metabólico ou dano celular à uma ativação da resposta imune. Aricioglu et al. (2019) demonstraram que o ECI aplicado por 6 semanas em ratos machos resultou em um aumento na expressão de mRNA dos componentes da via do inflamassoma NLRP3, caspase-1, ASC e da citocina IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal. Em concordância, Ozkartal et al. (2019) demonstraram que o ECI de 6 semanas aumentou as proteínas da via do inflamassoma, como NLRP3, caspase-1 e IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal de

ratos machos. Huang et al. (2018) verificaram que o ECI de 6 semanas aplicados em ratos machos provocou o aumento das proteínas NLRP3, caspase-1 e ASC, componentes da via do inflamassoma no hipocampo. Além disso, Geng et al. (2019) demonstraram que o ECI de 4 semanas em camundongos machos aumentou a densidade das proteínas Iba-1 e caspase-1, juntamente com um aumento na oligomerização do inflamassoma NLRP3, através dos seus componentes, NLRP3, ASC e caspase-1 no córtex pré-frontal. Liu et al. (2018) demonstraram que o ECI de 5 semanas aumentou a expressão de mRNA e das proteínas NLRP3, ASC e caspase-1 no hipocampo de camundongos machos.

Apesar das evidências da literatura, no presente estudo o protocolo de ECI não modificou os níveis de NLRP3, caspase-1 ou IL-1 $\beta$  com relação ao controle não estressado, em amostras de córtex pré-frontal ou hipocampo. Estes resultados sugerem que apesar dos efeitos comportamentais, nosso modelo de estresse não induziu um efeito significativo sobre a neuroinflamação. Contudo, a avaliação dos níveis proteicos não traduz a oligomerização e ativação do complexo do inflamassoma. Além disso, os protocolos de ECI na literatura, em sua maioria, são aplicados em ratos ou camundongos machos, sendo escasso a pesquisa relacionada aos seus efeitos em fêmeas, entretanto diferenças sexuais são descritas na clínica (LABONTÉ, et al., 2017; WILLIAMS et al., 2019; KESSLER, 2003; MARCUS et al., 2005).

O tratamento com glibenclamida (5 mg/kg) não modificou os níveis de Iba-1, NLRP3 ou caspase-1 no córtex pré-frontal ou hipocampo dos animais controle ou submetidos ao ECI. Entretanto a glibenclamida foi capaz de diminuir os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal de animais submetidos ao estresse comparado aos animais estressados e tratados com veículo, corroborando com estudos prévios. Diferente dos nossos resultados, Su et al. (2017) demonstraram que o tratamento crônico com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) por 6 semanas reverteu o aumento de IL-1 $\beta$  causado pelo ECI (6 semanas) no hipocampo de camundongos machos. Assim, podemos especular que a glibenclamida possa estar atuando por outros mecanismos de maturação de IL-1 $\beta$ , incluindo outros subtipos de inflamassomas, clivagem por proteases, ou mesmo aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias. Contudo, todos estes mecanismos ainda precisam ser elucidados.

A glibenclamida possui pouca permeabilidade na barreira hematoencefálica, sugerindo que seu efeito comportamental, seu efeito na normalização do eixo HPA ou mesmo na diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$  observados após o ECI podem ser efeitos indiretos mediados por mecanismos periféricos (por exemplo, modulação periférica da secreção de corticosterona, modulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica, inibição da via do NLRP3 e de outras vias inflamatórias em células imunes periféricas). Contudo, apesar das limitações, o

presente trabalho abre caminho para a investigação de novos alvos responsáveis pelos efeitos comportamentais da glibenclamida.

## 7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados comportamentais demonstraram que o estresse crônico imprevisível induz um comportamento tipo-depressivo e um prejuízo na memória espacial de curto prazo de camundongos fêmea. Alterações bioquímicas no córtex pré-frontal também foram observadas nos grupos submetidos ao ECI, como um aumento no imunoconteúdo do receptor de glicocorticoides. Os resultados bioquímicos negativos referentes aos imunoconteúdo de Iba-1, NLRP3 e caspase-1 podem indicar que nosso modelo de ECI não está associado a uma grande neuroinflamação, sendo necessário a investigação da atividade do inflamassoma NLRP3, sua oligomerização e recrutamento dos componentes de domínio caspase-1 clivada e ASC. Também foi demonstrado que a administração crônica de glibenclamida (5 mg/kg), por 21 dias, foi capaz de reverter as alterações comportamentais, o aumento nos níveis do receptor de GC no córtex pré-frontal provocados pelo ECI, além de reduzir os níveis de IL-1 $\beta$  nos animais estressados.

Como perspectiva pretendemos investigar outros componentes da via do inflamassoma NLRP3 responsáveis pela sua ativação e oligomerização, como o domínio ASC e NEK7, e seu outro produto formado, a IL-18. Também pretendemos estudar a relação de outros inflamassomas envolvidos na maturação e ativação das citocinas pró-inflamatórias, como NLRP1. Além disso, planejamos investigar as concentrações dos níveis de monoaminas como dopamina, serotonina e noradrenalina no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos ao ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg). Uma melhor elucidação da relação entre a neuroinflamação e o estresse, associadas ao desenvolvimento de um perfil tipo-depressivo nos modelos animais se faz necessária, englobando alterações nas células do sistema imunológico, como monócitos e macrófagos, modificações na permeabilidade da barreira hematoencefálica, transformações da micróglia associadas ao estresse e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-18 e IL-6, e anti-inflamatórias, como IL-10.

## 8. REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders** (DSM-5®). American Psychiatric Pub, 2013.

ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Antidepressants induce autophagy dependent-NLRP3-inflammasome inhibition in Major depressive disorder. **Pharmacological research**. Washington, p. 114-121, 2017.

ALCOCER-GÓMEZ, E.; CORDERO, M. D. NLRP3 inflammasome: a new target in major depressive disorder. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 294-295, 2014.

ANTONIUK, S. et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 99, p.101-116, abr. 2019.

ARICIOGLU, F. et al. Antidepressant-like Effects Induced by Chronic Blockade of the Purinergic 2X7 Receptor through Inhibition of Non-like Receptor Protein 1 Inflammasome in Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression in Rats. **Clinical Psychopharmacology And Neuroscience**. Washington, p. 261-272. abr. 2019.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **Lancet**. v. 373, n. 9678, p. 1905-17, 2009.

BAGLEY J.; MOGHADDAM B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. **Neuroscience**. v. 77, n. 1, p.65-73, 1997.

BATH, K. G.; SCHILIT, A.; LEE, F.S. Stress effects on BDNF expression: Effects of age, sex, and form of stress. **Neuroscience**, v. 239, p.149-156, jun. 2013.

BELLEAU, E. L.; TREADWAY, M. T.; PIZZAGALLI, D. A. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 6, p.443-453, mar. 2019.

BOUMPAS, D. T. et al. Glucocorticoid Therapy for Immune-Mediated Diseases: Basic and Clinical Correlates. **Annals Of Internal Medicine**, v. 119, n. 12, p.1198-1208, 15 dez. 1993.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J.A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nat Rev Immunol**. v. 17, n. 4, p. 233-34, 2017.

CAMARGO, A. et al. Augmentation effect of ketamine by guanosine in the novelty suppressed feeding test is dependent on mTOR signaling pathway. **Journal of Psychiatric Research**. v 115., p. 103-112, 2019.

CAN, A. D. et al. The mouse forced swim test. **Journal of visualized experiments**, v. 59, p.3638, 2012.

CAN, A. D. et al. The tail suspension test. **Journal of visualized experiments**, v. 59, p.3769, 2012.

CHAI, H. et al. Antidepressant Effects of Rhodomyrtone in Mice with Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p.157-164, 8 nov. 2018.

CHEN, F. et al. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid- $\beta$  across the blood–brain barrier and memory impairment in db / db mice. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 101, p.123-136, fev. 2016.

CHEN, W. et al. Effects of social isolation and re-socialization on cognition and ADAR1 (p110) expression in mice. **PeerJ**, v. 4, p. e2306, 2016.

CHRISTOFFEL, D. J.; GOLDEN, S. A.; RUSSO, S. J. Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders. **Reviews In The Neurosciences**, v. 22, n. 5, p.535-549, 1 jan. 2011.

CHROUSOS, G. P. The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. **New England Journal Of Medicine**, v. 332, n. 20, p.1351-1363, 18 maio 1995.

CHROUSOS, G. P.; DETERA-WADLEIGH, S. D.; KARL, M. Syndromes of Glucocorticoid Resistance. **Annals Of Internal Medicine**, v. 119, n. 11, p.1113-1124, 1 dez. 1993.

COHEN, L. et al. Depressive symptoms and cortisol rhythmicity predict survival in patients with renal cell carcinoma: role of inflammatory signaling. **PLoS One**. v. 7, n. 8, p. 1-8, 2012.

CONNOR T. J.; LEONARD B.E. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. **Life Sci** v. 62, p.583– 606, 1998.

COSTA, R. et al. Tactile stimulation of adult rats modulates hormonal responses, depression-like behaviors, and memory impairment induced by chronic mild stress: Role of angiotensin II. **Behavioural Brain Research**, p.112250-112262, out. 2019.

D'AQUILA, P. S.; BRAIN, P.; WILLNER, P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiology & behavior**, v. 56, n. 5, p. 861-867, 1994.

DHABHAR, F. S. et al. Stress-induced redistribution of immune cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones – Curt Richter Award Winner. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 9, p.1345-1368, set. 2012.

DOWLATI, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446-457, 2010.

DUDEK, K. A. et al. Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies. **European Journal of Neuroscience**, p.1-39, 13 set. 2019.

DULAWA, S. C. HEN, R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 4-5, p.771-783, jan. 2005.

DUMAN, R. S. et al. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nature Medicine**, v. 22, n. 3, p.238-249, mar. 2016.

ESMAEILI, M. H. et al. Glibenclamide mitigates cognitive impairment and hippocampal neuroinflammation in rats with type 2 diabetes and sporadic Alzheimer-like disease. **Behavioural Brain Research**, p.112359-112368, nov. 2019.

ESMAEILI, M. H.; BAHARI, B.; SALARI, A. ATP-sensitive potassium-channel inhibitor glibenclamide attenuates HPA axis hyperactivity, depression- and anxiety-related symptoms in a rat model of Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**. Washington, p. 265-276. mar. 2018.

EVANS-LACKO, S.; KNAPP, M. Global patterns of workplace productivity for people with depression: absenteeism and presenteeism costs across eight diverse countries. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, v. 51, n. 11, p. 1525-1537, 2016.

FELGER, J. C.; LOTRICH, F. E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199-229, 2013.

FENG, X. et al. Glucocorticoid-Driven NLRP3 Inflammasome Activation in Hippocampal Microglia Mediates Chronic Stress-Induced Depressive-Like Behaviors. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, v. 12, p.1-15, 29 ago. 2019.

FINSTERWALD, C.; ALBERINI, C. M. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. **Neurobiol Learn Mem**. v. 0, p. 17–29, 2015.

FRANK, M. G. et al. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to proinflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, p. 191-200, 2014.

FRANK, M. G.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. The permissive role of glucocorticoids in neuroinflammatory priming: mechanisms and insights. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 22, n. 4, p. 300, 2015.

FREITAS, A. E.; NEIS, V. B.; RODRIGUES, A. L. S.. Agmatine, a potential novel therapeutic strategy for depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 12, p.1885-1899, 2016.

FREITAS, A. E. et al. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p.143-150, abr. 2014.

FU, S. et al. Tetramethylpyrazine ameliorates depression by inhibiting TLR4-NLRP3 inflammasome signal pathway in mice. **Psychopharmacology**. Washington, p. 2173-2185. mar. 2019.

GAINNEY, S. J. et al. Short-term high-fat diet (HFD) induced anxiety like behaviors and cognitive impairment are improved with treatment by glyburide. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 10, 2016.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 133, n. 9, p.1-3, set. 2013.

GENG, J. et al. Andrographolide triggers autophagy-mediated inflammation inhibition and attenuates chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depressive-like behavior in mice. **Toxicology And Applied Pharmacology**. Washington, p. 1-10. set. 2019.

HEIDT, T. et al. Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**, v. 20, n. 7, p.754-758, 22 jun. 2014.

HIKA, B.; AL KHALILI, Y. Neuronatomy, Prefrontal Association Cortex. StatPearls. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, Aug 13, 2019.

HILL, M. N. et al. Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. **Neuroscience And Biobehavioral Reviews**. Washington, p. 2085-2117. jul. 2012.

HO, S. C. et al. Clinical and economic impact of non-adherence to antidepressants in major depressive disorder: **A systematic review**. **Journal of affective disorders**, v. 193, p. 1-10, 2016.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, n. 2, p.171-186, fev. 2009.

HU, W. et al. Chronic glucocorticoids exposure enhances neurodegeneration in the frontal cortex and hippocampus via NLRP-1 inflammasome activation in male mice. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 52, p.58-70, fev. 2016.

HUANG, Q. et al. Salvianolic acid B abolished chronic mild stress-induced depression through suppressing oxidative stress and neuro-inflammation via regulating NLRP3 inflammasome activation. **Journal Of Food Biochemistry**, [s.l.], p.12742-12751, 17 dez. 2018.

IMAI, Y. et al. A Novel GeneIba1in the Major Histocompatibility Complex Class III Region Encoding an EF Hand Protein Expressed in a Monocytic Lineage. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 3, p.855-862, jul. 1996.

ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Molecular Brain Research**, v. 57, n. 1, p.1-9, jun. 1998.

IWATA, M. et al. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, behavior, and immunity**, v. 31, p. 105-114, 2013.

JURUENA, M. F; CLEARE, A. J; PARIANTE, C. M. The hypothalamic pituitary adrenal axil, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 189-201, 2004.



KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 112, n. 25, p. 7833-7838, 2015.

KASTER, M. P. et al. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 690-696, 2007.

KAUFMANN, F. N. et al. Nlrp3 inflammasome-driven pathways in depression: clinical and preclinical findings. **Brain, behavior, and immunity**, 2017.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The Epidemiology of Depression Across Cultures. **Annual Review of Public Health**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.119-138, 18 mar. 2013.

KESSLER, R. Epidemiology of women and depression. **Journal Of Affective Disorders**, v. 74, n. 1, p.5-13, mar. 2003.

KIGERL, K. A. et al. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. **Experimental neurology**, v. 258, p. 5-16, 2014.

KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p.463-475, 13 maio 2005.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol**, v. 25, p.1107-1125, 2015.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p.312-318, ago. 1996.

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

LABONTÉ, B. et al. Sex-specific transcriptional signatures in human depression. **Nature Medicine**, v. 23, n. 9, p.1102-1111, 21 ago. 2017.

LAMKANFI, M. et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. **The journal of cell biology**, v. 187, n. 1, p. 61-70, 2009.

LEAL, R. B. et al. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, 178(1), 44-51, 2002.

LEAL, R. B. et al. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. **Toxicology**, 234(1-2), 34-43. 2007.

LI, H. et al. Senegenin exerts anti-depression effect in mice induced by chronic un-predictable mild stress via inhibition of NF-κB regulating NLRP3 signal pathway. **International Immunopharmacology**. Washington, p. 24-32. out. 2017.

LIU, S. et al. Anti-Depressant-Like Effect of Sinomenine on Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression in a Mouse Model. **Medical Science Monitor**, v. 24, p.7646-7653, 26 out. 2018.

LIU, R.-J.; AGHAJANIAN, G. K. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: Role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 1, p.359-364, 2 jan. 2008.

LICINIO J.; WONG M. L. The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. **Mol Psychiatry**, v. 4, p.317–327, 1999.

LU, Q. et al. Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression. **Behavioural Brain Research**, p. 1-10. out. 2019.

MAGARIÑOS, A.M.; MCEWEN, B.S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p.89-98, nov. 1995.

MAILLIET, F. et al. Protection of stress-induced impairment of hippocampal/prefrontal LTP through blockade of glucocorticoid receptors. **Experimental Neurology**, v. 211, n. 2, p.593-596, jun. 2008.

MARCUS, S. M. et al. Gender differences in depression: Findings from the STAR\*D study. **Journal Of Affective Disorders**, v. 87, n. 2-3, p.141-150, ago. 2005.

MARSDEN, W. N. Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, v. 43, p.168-184, jun. 2013.

MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p.1353-1363, 25 set. 2015.

MÉNARD, C. et al. Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 12, p.1752-1760, 13 nov. 2017.

MÉNARD, C. et al. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p.62-80, 13 jun. 2016.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-741, 2009.

MOREAU, J. L. et al. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression: sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. **Behavioural pharmacology**, v. 6, n. 7, p. 682-687, 1995.

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

NEIS, V. B. et al. Single administration of agmatine reverses the depressive-like behavior induced by corticosterone in mice: Comparison with ketamine and fluoxetine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 173, p.44-50, 2018.

NEIS, V. B. Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da agmatina em modelos animais. Tese (Doutorado em Bioquímica). Florianópolis. **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2017.

NEIS, V. B. et al. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 6, p.959-971, 2016.

NEIS, V. B. et al. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 150-151, p.108-114, 2016.

NEIS, V. B. et al. Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 130, p. 9-14, 2015.

NEIS, V. B. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  is abolished by agmatine administration. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 261, p.336-344, 2014.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 11s, p. 1068, 2002.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

OHSAWA, K. et al. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. **Journal Of Neurochemistry**, v. 88, n. 4, p.844-856, 14 jan. 2004.

OHSAWA, K. et al. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 1, p.3073-3084, 2000.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature reviews. Disease primers**, v. 15, n. 2, p. 16065, 2016.

OZKARTAL, C. S. et al. Antidepressant-like effects of agmatine and NOS inhibitors in chronic unpredictable mild stress model of depression in rats: The involvement of NLRP inflammasomes. **Brain Research**. New York, p. 1-12. set. 2019.

PAN, Y. et al. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$ -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 41, p. 90-100, 2014.

PEREIRA, A. C.; CARVALHO, M. C.; PADOVAN, C. M. Both serotonergic and noradrenergic systems modulate the development of tolerance to chronic stress in rats with lesions of the serotonergic neurons of the median raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 357-358, p.39-47, jan. 2019.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. **Anal Biochem** 83(2): 346-356, 1977.

PIZZAGALLI, D. A. et al. Assessment of Striatal Dopamine Transporter Binding in Individuals With Major Depressive Disorder: In Vivo Positron Emission Tomography and Postmortem Evidence. **Jama Psychiatry**, p. 854-861. maio 2019.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 1, p.22-37, 30 nov. 2011.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

POST, R. J; WARDEN, M. R. Melancholy, anhedonia, apathy: the search for separable behaviors and neural circuits in depression. **Current Opinion In Neurobiology**, p. 192-200. abr. 2018.

POWELL, N. D. et al. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via  $\beta$ -adrenergic induction of myelopoiesis. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 110, n. 41, p. 16574-16579, 2013.

QIAO, H. et al. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. **Neural Plasticity**, v. 2016, p.1-26, 2016.

RAEDLER, T. J. Inflammatory mechanisms in major depressive disorder. **Current opinion in psychiatry**, v. 24, n. 6, p. 519-525, 2011.

RAIVICH, G. et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Research Reviews**, v. 30, n. 1, p.77-105, jul. 1999.

ROCHER, C. et al. Acute Stress-induced Changes in Hippocampal/Prefrontal Circuits in Rats: Effects of Antidepressants. **Cerebral Cortex**, v. 14, n. 2, p.224-229, 1 fev. 2004.

SAPOLSKY, R. M.; UNO, H.; REBERT, C. S.; FINCH, C. E. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. **Journal of Neuroscience**. v. 10, n. 9, p. 2897- 2902, 1990.

SCHIEPERS, O. J. G; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Progress in Neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201-217, 2004.

SCHOENFELD, T. J. et al. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 12, p.914-923, dez. 2017.

SIMARD, J. M. et al. Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. **Journal of cerebral blood flow & metabolism**, v. 32, n. 9, p. 1699-1717, 2012.

SINGHAL, G. et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, 2014.

SHELLINE, Y.I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 338-52, 2003.

SHEN, J. et al. The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. **Journal Of Affective Disorders**, v. 248, p.81-90, abr. 2019.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383, 2006.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 85, n. 3, p.367-370, mar. 1985.

STOKUM, J. A. et al. Glibenclamide pretreatment protects against chronic memory dysfunction and glial activation in rat cranial blast traumatic brain injury. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p.43-53, ago. 2017.

SU, W. et al. Antidiabetic drug glyburide modulates depressive-like behavior comorbid with insulin resistance. **Journal Of Neuroinflammation**. London, p. 1-12. 30 out. 2017.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P.-y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 8, p.477-489, 29 abr. 2019.

TSUCHIYA, K.; HARA, H. The inflammasome and its regulation. **Critical reviews™ in immunology**, v. 34, n. 1, 2014.

WALKER, D. J.; SPENCER, K. A. Glucocorticoid programming of neuroimmune function. **General and Comparative Endocrinology**, [Epub ahead of print], 2017.

WALKER, A. K. et al. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 80-101, 2014.

WALSH, J. G.; MURUVE, D. A.; POWER, C. Inflammasomes in the CNS. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 84, 2014.

WANG, Q. et al. The recent progress in animal models of depression. **Progress In Neuropsychopharmacology And Biological Psychiatry**, v. 77, p.99-109, jul. 2017.

WEBER, M. D; GODBOUT, J. P; SHERIDAN, J. F. Repeated Social Defeat, Neuroinflammation, and Behavior: Monocytes Carry the Signal. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.46-61, 20 jun. 2016.

WILLIAMS, E. S. et al. Androgen-Dependent Excitability of Mouse Ventral Hippocampal Afferents to Nucleus Accumbens Underlies Sex-Specific Susceptibility to Stress. **Biological Psychiatry**, p.1-10, ago. 2019.

WILLNER, P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. **Neurobiology Of Stress**. Washington, p. 68-77. fev. 2017.

- WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology Of Stress**. Washington, p. 78-93. ago. 2016.
- WILLNER, P. BELZUNG, C. Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? **Psychopharmacology**. Washington, p. 3473-3495. ago. 2015.
- WILLNER, P. MUSCAT, R. PAPP, M. Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression. **Neuroscience And Biobehavioral Reviews**, Washington, v. 16, n. 1, p.525-534, fev. 1992.
- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**. Washington, p. 1-16. jan. 1984.
- WOHLEB, E. S. et al. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. **Nature reviews neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 497-511, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- YAMADA, K. et al. Involvement of hippocampal NMDA receptors in encoding and consolidation, but not retrieval, processes of spontaneous object location memory in rats. **Behavioural brain research**, v. 331, p. 14-19, 2017.
- YIRMIYA, R.; RIMMERMAN, N.; RESHEF, R. Depression as a microglial disease. **Trends in neurosciences**, v. 38, n. 10, p. 637-658, 2015.
- ZHANG, W-Y. et al. Curcumin relieves depressive-like behaviors via inhibition of the NLRP3 inflammasome and kynurenine pathway in rats suffering from chronic unpredictable mild stress. **International Immunopharmacology**. Washington, p. 138-144. fev. 2019.
- ZHANG, G. et al. A protective role of glibenclamide in inflammation-associated injury. **Mediators of inflammation**, v. 2017, p. 3578702, 2017.