

Fernanda Neutzling Kaufmann

**ENVOLVIMENTO DO INFLAMASSOMA NLRP3 E DO  
IMUNORRECEPTOR CD300F NO TRANSTORNO  
DEPRESSIVO MAIOR**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manuella Pinto Kaster

Coorientador: Prof. Dr. Hugo Peluffo

Florianópolis  
2019

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

Kaufmann, Fernanda Neutzling  
Envolvimento do inflamassoma NLRP3 e do  
imunorreceptor CD300f no transtorno depressivo  
maior / Fernanda Neutzling Kaufmann ; orientadora,  
Manuella Pinto Kaster, coorientador, Hugo Peluffo,  
2019.

172 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

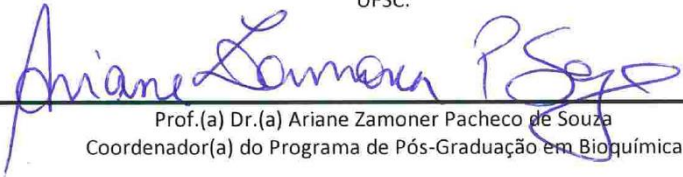
1. Bioquímica. 2. Depressão. 3. Anedonia. 4.  
Inflamação. 5. Monoaminas. I. Kaster, Manuella Pinto  
. II. Peluffo, Hugo. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. IV. Título.

**“Envolvimento do inflamassoma NLRP3 e do imunorreceptor CD300F no transtorno depressivo maior”**

Por

**Fernanda Neutzling Kaufmann**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (003/2019/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.


  
Prof.(a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

  
Dr.(a) Manuella Pinto Kaster (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr.(a) Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

  
Dr.(a) Joana Margarida Navalho Gaspar (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr.(a) Cilene Lino de Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2019.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família (Mãe, Pai, aos meus irmãos Vitória, Nathália e João Vitor, ao Vitor e a Vó Marlene) por todo suporte e apoio durante essa longa jornada que é a vida acadêmica, principalmente durante o doutorado. Nunca foi fácil ter que dizer “tchau” ao sair para as longas viagens, longe de casa. Gostaria de agradecer ao meu marido Jonas por todo o suporte imensurável e inexplicável. Eis alguém que me deu forças e asas para voar. Alguém que me apoiou em cada decisão, cada viagem e vivência longe de casa. Agradeço também a Floke, minha filhotinha de 4 patinhas que adotei em Florianópolis. Nunca achei que um animal (sem ser o ser humano) poderia mudar tanto a minha vida, maneira de ser e de pensar. Ela me tornou um ser humano melhor, mais sensível e menos egoísta.

Profissionalmente agradeço a minha orientadora Dra. Manuella Kaster por abrir as portas para o novo, por ter me aceitado como primeira aluna de doutorado na Universidade Federal de Santa Catarina e por ter me aceitado com um projeto que eu queria muito desenvolver, o qual não era sua linha de pesquisa primária. Ela sempre foi muito compreensiva, amável, aberta ao novo, amiga e inteligente, sempre tinha uma solução para qualquer problema, ela é um exemplo de pessoa e profissional para todos que a cercam. Eu recomendo-a para todos os alunos. Obrigada principalmente por nunca ter fechado as portas quando eu quis sair por aí e fazer trabalhos científicos e colaborações em outros lugares, isso me fez crescer demais!

Agradeço também os profissionais que passaram pelo meu caminho nessa jornada como a Dra. Gabriele Ghisleni, que não hesitou em reabrir as portas do seu laboratório na Universidade Católica de Pelotas para eu fazer a parte clínica do meu projeto de doutorado, lá eu sinto que sempre tenho um cantinho e estou em casa. A Gabriele foi minha orientadora desde 2011 quando eu estava na iniciação científica, depois no mestrado e agora, embora não oficialmente, ela não deixou de cumprir esse papel. Outro exemplo de profissional e de pessoa que eu me espelho muito.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao Dr. Hugo Peluffo (meu coorientador de doutorado) e a sua esposa e companheira de trabalho Dra. Natalia Lago. Essa história foi muito imprevisível! A primeira vez que entrei em contato com o Hugo foi para pedir um estágio breve em seu laboratório (Laboratório de Neuroinflamação e Terapia Gênica do Instituto Pasteur de Montevideo - Uruguai). Sempre que fazemos esses contatos ficamos com medo de ser

rejeitados, principalmente quando não temos alguém para mediar a situação, ninguém o conhecia, nem eu!

Sem hesitar ele aceitou a minha ida para seu laboratório a fim de caracterizar o comportamento dos animais nocautes para o imunorreceptor CD300f, pois seu laboratório não trabalhava com comportamento. Então, eu permaneci lá de agosto até outubro de 2016 com auxílio da International Brain Research Organization (IBRO - Short Stay Award) e com a promessa de voltar! Em 2017 ganhei o prêmio da International Society for Neurochemistry (ISN - CAEN) e então retornei ao seu laboratório, onde permaneci de novembro de 2017 até final de agosto de 2018. Essa vivência foi algo esplêndido, encontrei pessoas tão maravilhosas e companheiras que eu não consigo descrever, aprendi tanto e trabalhei com tanto amor e dedicação como nunca senti antes, e olha que eu sou uma amante de primeira da ciência! O Uruguai abriu a minha cabeça e me fez ver horizontes de uma forma inexplicável, me fez ver o que realmente importa na ciência e na minha própria vida pessoal, me fez lembrar que estamos aqui buscando algo melhor e não apenas produzindo, me fez ignorar as competições profissionais (aliás, elas pareciam não existir naquele ambiente) e me fez ver que quantidade não é qualidade. Me tornou crítica ao meu próprio trabalho, ao trabalho dos outros e ao sistema educacional e científico que vivemos.

Aos companheiros de bancada quero agradecer imensamente e especialmente a Priscila Batista da Rosa e a Vivian Binder Neis que me ensinaram tudo dentro do laboratório, não foi fácil vir de outra universidade com uma visão totalmente clínica e ter que trabalhar com ciência básica, sem vocês eu não teria conseguido nem fazer uma gavagem nos animais, obrigado! Além disso, quero agradecer a Priscila por todo apoio extraoficial, pelas nossas conversas, almoços juntas e suporte científico e psicológico! Além disso, gostaria de agradecer imensamente a Clarissa Riberio Bastos da Universidade Católica de Pelotas por toda ajuda de bancada e estatística nos estudos clínicos, além de agradecer a ela pela nossa imensa amizade que já vem de anos! Aos amigos e companheiros de trabalho do Instituto Pasteur de Montevideo Bruno Pannuzio, Andrés Cawen Curbelo, Daniela Ali, María Luciana Negro Demontel e Gabriel Díaz. Também, agradeço ao Gudrian Lopes de Almeida, a Ingrid Selhorst e ao Dr. Alcir Luiz Dafre por todo o suporte com os experimentos realizados em seu laboratório.

Não poderia deixar de agradecer aos alunos do nosso laboratório. Primeiramente, a Nicolle Platt, uma menina tranquila, sempre feliz e pronta para ajudar a todos. Agradeço a ela pela maravilhosa convivência

que tivemos nesses anos e por toda ajuda em todos os experimentos e momentos de vida, inclusive de moradia e pelos bolos de chocolate! Agradeço também a Bruna Pieroni, Axel Fogaça e Evelyn Oliveira, que apesar do pequeno período de convivência, se mostraram pessoas tão queridas, de boa convivência e muito solícitas. Agradeço a todos os alunos do LANED e a Dra. Ana Lúcia Rodrigues Severo pela convivência maravilhosa e pelo auxílio em todos os experimentos realizados na Universidade Federal de Santa Catarina.

Um agradecimento especial à CAPES, ISN e IBRO pelo apoio financeiro recebido durante o doutorado, à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e seus funcionários, ao Lameb (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia) e ao Biotério da universidade. Agradeço também aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização desta etapa e não foram mencionados.





## RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno heterogêneo e multifatorial, envolvendo muitos sistemas fisiológicos. Estudos têm demonstrado que o estresse crônico, considerado o principal fator de risco ambiental para o TDM, pode promover a desregulação do sistema imune levando a um aumento do perfil inflamatório em pacientes com TDM e em modelo animais de depressão. Neste sentido, o objetivo desta tese foi avaliar o envolvimento do inflamassoma NLRP3 e do imunorreceptor CD300f no TDM, duas proteínas expressas na microglia e envolvidas na exacerbação e controle da inflamação, respectivamente. Nossos resultados mostram que o estresse crônico imprevisível (ECI) aplicado em camundongos Swiss fêmeas por 21 dias induziu um comportamento depressivo e prejuízo de memória. Além disso, o ECI levou a um aumento nos níveis de noradrenalina, diminuição nos níveis de dopamina e aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal. O tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) utilizada como um inibidor do NLRP3, foi capaz de prevenir as alterações comportamentais induzidas pelo ECI, além de prevenir a diminuição de dopamina e o aumento de IL- $\beta$  no córtex pré-frontal. Além disso, a glibenclamida por se aumentou os níveis de noradrenalina no córtex pré-frontal. Para adicionar um valor translacional aos nossos achados, nós demonstramos que um polimorfismo de troca única no gene NLRP3 (rs10754558, C/G) não está diretamente associado ao diagnóstico de TDM em um estudo transversal de base populacional avaliando 615 indivíduos controles e 485 indivíduos com TDM. Contudo, o genótipo GG foi associado a níveis séricos maiores de IL-1 $\beta$  em indivíduos com o genótipo GG e com o diagnóstico de TDM (avaliando uma subamostra de 161 indivíduos). A fim de avaliar o papel dos imunorreceptores CD300f no TDM, usamos camundongos C57BL/6J com depleção genética dos imunorreceptores CD300f (CD300f $^{-/-}$ ). As análises comportamentais demonstraram que os animais fêmeas CD300f $^{-/-}$  com 5 meses de idade apresentam um comportamento depressivo e anedônico que é observado também aos 18 meses de idade. As fêmeas CD300f $^{-/-}$  com 5 meses de idade apresentaram alterações na expressão gênica das citocinas IL-6, IL1RN e IL-10 no cérebro indicando um estado neuroinflamatório moderado e, também apresentaram uma diminuição nos níveis hipocâmpais de noradrenalina. O tratamento agudo com bupropiona (10 mg/kg, i.p.), um inibidor da recaptação de noradrenalina/dopamina melhorou o comportamento anedônico nas fêmeas CD300f $^{-/-}$ . Por outro lado, o tratamento agudo com lipopolissacarídeo (LPS, 2 mg/kg i.p.) em

camundongos fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> exacerbou o comportamento anedônico quando comparado as fêmeas selvagens que também receberam LPS. Em humanos, o alelo T do polimorfismo de troca única (rs2034310 C/T) no gene dos imunorreceptores CD300f foi associado à proteção contra o TDM especialmente em mulheres em um estudo transversal de base populacional que incluiu 625 controles e 485 indivíduos com TDM. Ao todo, nossos dados em animais ampliam os mecanismos que associam o complexo inflamassoma NLRP3 e o TDM, sugerindo um possível envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica e, pela primeira vez, caracterizam o potencial dos imunorreceptores CD300f na regulação do humor e dos processos hedônicos. Nossos resultados em humanos reforçam a ideia de que o TDM é uma condição heterogênea na qual a identificação de potenciais marcadores genéticos associados à inflamação e respostas neuroimunes podem ser úteis não apenas como biomarcadores de diagnóstico, mas também como novos alvos para uma intervenção farmacológica em grupos específicos de pacientes.

**Palavras-chave:** Depressão. Anedonia. Inflamação. Inflamassoma NLRP3. Imunorreceptores CD300f. Monoaminas.

## ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is a multifactorial heterogeneous disorder involving many physiological systems. Studies have shown that chronic stress, considered the main environmental risk factor for MDD, may promote the dysregulation of the immune system leading to an increase in the inflammatory profile in patients with MDD and in animal models of depression. In this sense, the aim of this thesis was to evaluate the involvement of NLRP3 and CD300f immunoreceptors in MDD, two proteins expressed in microglia and involved in exacerbation and control of inflammation, respectively. Our results show that chronic unpredictable stress (CUS) applied in female Swiss mice for 21 days induced a depressive behavior and memory impairment. In addition, CUS led to an increase in noradrenaline levels, a decrease in dopamine levels, and an increase in IL-1 $\beta$  levels in the prefrontal cortex. Treatment with glibenclamide (5 mg/kg, p.o.) used as an inhibitor of NLRP3 was able to prevent behavioral changes induced by CUS in addition to preventing the decrease of dopamine and the increase of IL- $\beta$  in the prefrontal cortex. In addition, glibenclamide per se increased noradrenaline levels in prefrontal cortex. To add a translational value to our findings, we demonstrated that a single nucleotide polymorphism in the NLRP3 gene (rs10754558, C/G) was not directly associated with MDD diagnosis in a cross-sectional population-based study evaluating 615 control subjects and 485 individuals with MDD. However, the GG genotype was associated with higher serum levels of IL-1 $\beta$  in individuals with the GG genotype and with the diagnosis of MDD (in a subsample of 161 individuals). In order to investigate the role of CD300f immunoreceptors in MDD, we used C57BL/6J mice with genetic depletion of the CD300f (CD300f $^{-/-}$ ) immunoreceptors. Behavioral analysis showed that 5 months old female CD300f $^{-/-}$  mice presented depressive and anhedonic behavior that is also observed at 18 months of age. The 5-month-old CD300f $^{-/-}$  females presented alterations in the gene expression of IL-6, IL1RN and IL-10 cytokines in the brain indicating a moderate neuroinflammatory status and presented decreased hippocampal noradrenaline levels. Acute treatment with bupropion (10 mg/kg, i.p.), a noradrenaline/dopamine reuptake inhibitor improved the anhedonic behavior in CD300f $^{-/-}$  females. On the other hand, acute treatment with lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg i.p.) in female CD300f $^{-/-}$  mice exacerbated anhedonic-like behavior when compared to wild-type females who also received LPS. In humans, the T allele from the single nucleotide polymorphism on CD300f

immunoreceptors (rs2034310 C/T) was associated with protection against MDD especially in women in a cross-sectional population-based study that included 625 controls and 485 subjects with MDD. Overall, our studies in rodents amplify the mechanisms that associate the NLRP3 inflammatory complex to MDD, suggesting a possible involvement of noradrenergic and dopaminergic neurotransmission, and for the first time characterize the potential of CD300f immunoreceptors in the regulation of mood and hedonic processes. Our results in humans reinforce the idea that MDD is a heterogeneous condition in which the identification of potential genetic markers associated with inflammation and neuroimmune responses may be useful not only as diagnostic biomarkers but also as new targets for pharmacological intervention in specific groups of patients.

**Keywords:** Depression. Anhedonia. Inflammation. NLRP3 Inflammasome. CD300f Immunoreceptors. Monoamines.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Heterogeneidade das alterações fisiopatológicas observadas no TDM.....	31
Figura 2. Eixo HPA e sistema nervoso autônomo na resposta ao estresse.....	34
Figura 3. Mecanismos de comunicação bidirecional das respostas inflamatórias.....	41
Figura 4. Componentes do inflamassoma e domínios estruturais.....	46
Figura 5. Sinalização mediada pelo inflamassoma NLRP3...	48
Figura 6. Representação esquemática dos imunorreceptores CD300 em humanos e em roedores.....	54

### RESULTADOS

#### Capítulo I: Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no Transtorno Depressivo Maior

##### **1. Estudo em roedores: O tratamento com glibenclamida previne o comportamento depressivo induzido pelo estresse crônico e induz alterações neuroquímicas e inflamatórias**

Figura 1. Delineamento do estudo.....	67
Figura 2. Efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias no peso corporal, peso da adrenal e níveis séricos de glicose.....	75
Figura 3. Efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias nos comportamentos associados à depressão e locomoção espontânea.....	77
Figura 4. Efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias no comportamento associado à ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado.....	78
Figura 5. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias na memória espacial avaliada no teste de realocação de objetos.....	79

Figura 6. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclâmida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias nos níveis de caspase-1.....	80
Figura 7. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclâmida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias sobre os níveis de IL-1 $\beta$ .....	83

**2. Estudo em humanos: Efeito do polimorfismo de troca única rs10754558 no gene do inflamassoma NLRP3, níveis séricos de interleucina-1 $\beta$  e prevalência do Transtorno Depressivo Maior**

Figura 1. Níveis periféricos de IL-1 $\beta$ de acordo com o genótipo e diagnóstico.....	97
--	----

**Capítulo II: Envolvimento do imunorreceptor CD300f no Transtorno Depressivo Maior**

**1. Estudo em roedores: A deleção genética do imunorreceptor CD300f induz alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao Transtorno Depressivo Maior**

Figura 1. Efeito da depleção genética dos receptores CD300f na locomoção espontânea e habituação.....	110
Figura 2. Comportamento depressivo, motivacional e anedônico em fêmeas CD300f $^{-/-}$ de cinco meses de idade.....	111
Figura 3. Avaliação dos comportamentos associados à ansiedade em fêmeas CD300f $^{-/-}$ de cinco meses de idade....	112
Figura 4. Alterações comportamentais em machos de cinco meses de idade.....	113
Figura 5. Avaliação de comportamentos associado à locomoção, depressão e anedonia em fêmeas com 18 meses de idade.....	115
Figura 6. Alterações nos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos no hipocampo das fêmeas CD300f $^{-/-}$ .....	116

Figura 7. O tratamento agudo com bupropiona melhora o comportamento anedônico nas fêmeas CD300f <sup>-/-</sup> com 5 meses de idade .....	117
Figura 8. Efeito da depleção genética dos receptores CD300f <sup>-/-</sup> na sinalização mediada pelo inflamassoma NLRP3 .....	119
Figura 9. Sinalização mediada por outras citocinas no cérebro das fêmeas CD300f <sup>-/-</sup> .....	120
Figura 10. O tratamento com LPS exacerba o comportamento anedônico nas fêmeas CD300f <sup>-/-</sup> com 5 meses de idade .....	121

**2. Estudo em humanos: Polimorfismo nos receptores CD300f e proteção contra o Transtorno Depressivo Maior em um estudo transversal de base populacional**

Figura 1: Níveis periféricos de IL-1 $\beta$ de acordo com o genótipo.....	134
--	-----

**CONCLUSÃO**

Figura 1: Resumo dos resultados obtidos.....	139
--	-----

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1. Critério diagnóstico para o transtorno depressivo maior segundo o DSM-5.....	28
Tabela 2. Ação das citocinas, definidas pela célula-alvo e suas funções primárias.....	39

### RESULTADOS

#### Capítulo I: Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no Transtorno Depressivo Maior

##### 1. Estudo em roedores: O tratamento com glibenclamida previne o comportamento depressivo induzido pelo estresse crônico e induz alterações neuroquímicas e inflamatórias

Tabela 1. Protocolo de estresse crônico imprevisível.....	68
Tabela 2. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida sobre os níveis de neurotransmissores monoaminérgicos.....	82

##### 2. Estudo em humanos: Efeito do polimorfismo de troca única rs10754558 no gene do inflamassoma NLRP3, níveis séricos de interleucina-1 $\beta$ e prevalência do Transtorno Depressivo Maior

Tabela 1. Características sociodemográficas e clínicas da amostra de acordo com o diagnóstico para o TDM.....	94
Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica de acordo com o diagnóstico para o TDM.....	96



## **Capítulo II: Envolvimento do imunorreceptor CD300f no Transtorno Depressivo Maior**

### **1. Estudo em roedores: A deleção genética do imunorreceptor CD300f induz alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao Transtorno Depressivo Maior**

### **2. Estudo em humanos: Polimorfismo nos receptores CD300f e proteção contra o Transtorno Depressivo Maior em um estudo transversal de base populacional**

Tabela 1. Características sociodemográficas e clínicas da amostra de acordo com o diagnóstico para o TDM.....	132
Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica de acordo com o diagnóstico para o TDM.....	133
Tabela 3. Distribuição genotípica e alélica de acordo com o sexo e o diagnóstico para o TDM.....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AIM2	Ausente em melanoma-2
ASC	<i>Adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a card</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
AVP	Arginina vasopressina
BHE	Barreira hemaencefálica
BIR	Domínio repetitivo inibidor de baculovírus
BSA	Albumina bovina sérica
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CD300f	Subtipo de receptor pertencente a família dos receptores CD300
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CTRA	Resposta transcricional conservada frente a adversidades
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DM	Depressão Maior
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DSM-5	Manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais - 5ª edição
ECI	Estresse crônico imprevisível
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-GSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos
Grb2	<i>Proteína 2 ligada a receptores</i> para fatores de crescimento
GWAS	<i>Genoma wide scan study</i>
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-18	Interleucina-18

IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
ITIM	Sequências de inibição de imunorreceptor baseada em tirosina
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Domínio repetido rico em leucina
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MyD88	Proteína adaptadora de resposta primária à diferenciação mielóide 88
NAIPs	Proteínas inibidoras da apoptose neuronal
NATCH	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein (naip)</i> , <i>mhc class ii transcription activator (ciita)</i> , <i>incompatibility locus protein from podospora anserina (het-e)</i> , and <i>telomerase-associated protein (tp1)</i>
NBD	Domínio de ligação a nucleotídeos
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NLR	Receptor semelhante ao nod
NLRC4	Família de receptores do tipo nod contendo um domínio de recrutamento de caspases card 4
NLRP1	Família de <i>receptores do tipo nod</i> contendo o domínio <i>pirina 1</i>
NLRP2	Família de <i>receptores do tipo nod</i> contendo o domínio <i>pirina 2</i>
NLRP3	Família de <i>receptores do tipo nod</i> contendo o domínio <i>pirina 3</i>
NOD	Domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo
NR100	Domínio amino-terminal do nlrp1 de roedores com 100 aminoácidos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PRR	Receptor de reconhecimento padrão citosólico
PYD	Domínio de pirina
RC	Razão de Chances

RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RR	Risco Relativo
SHP-1	<i>Small heterodimer partner 1</i>
SHP-2	<i>Small heterodimer partner 2</i>
SIT	Transportadores de influxo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de troca única – <i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TCA	Teste do campo aberto
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TH	Transtorno de humor
THP-1	Linhagem humana de células de leucemia monocítica aguda
TLR	Receptores do tipo toll
TNF	Teste do nado forçado
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TRIF	<i>Toll-interlekin 1 receptor (tir)-domain containing adapter-inducing interferon <math>\beta</math></i>
TSC	Teste de suspensão pela cauda
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Y	Tirosina
YLD	Anos vividos com incapacidade
3' UTR	<i>Three prime untranslated region</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1	Transtorno depressivo maior: caracterização, epidemiologia e comorbidades.....	27
1.2	Estresse e alterações fisiopatológicas no transtorno depressivo maior.....	32
1.3	O sistema imunológico no transtorno depressivo maior.....	36
1.4	O inflamassoma NLRP3 no transtorno depressivo maior.....	44
1.5	O papel do imunorreceptor CD300f na resposta imunológica.....	52
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>59</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>61</b>
3.1	Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no transtorno depressivo maior.....	61
3.2	Envolvimento dos imunorreceptores CD300f no TDM.....	61
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>62</b>
4.1	Objetivo geral.....	62
4.2	Objetivos específicos.....	62
4.2.1	Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no transtorno depressivo maior.....	62
4.2.2	Envolvimento do imunorreceptor CD300f no transtorno depressivo maior.....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>

**Capítulo I: Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no Transtorno Depressivo Maior..... 64**

**1. Estudo em roedores: O tratamento com glibenclamida previne o comportamento depressivo induzido pelo estresse crônico e induz alterações neuroquímicas e inflamatórias..... 64**

1	Métodos.....	66
1.1	Animais, tratamento e delineamento do estudo..	66
1.2	Protocolo experimental de ECI de 21 dias.....	68
1.3	Análises comportamentais.....	68
1.3.1	Teste do campo aberto.....	69
1.3.2	Teste de suspensão pela cauda .....	69
1.3.3	Teste do nado forçado.....	69
1.3.4	Teste do labirinto em cruz elevado.....	70
1.3.5	Teste de realocação de objetos .....	70
1.4	Avaliação do ciclo estral.....	71
1.5	Obtenção das amostras, peso da adrenal níveis de glicose no sangue.....	71
1.6	Western Blot.....	72
1.7	Cromatografia Líquida de alta resolução (HPLC).....	72
1.8	ELISA.....	73
1.9	Análises estatísticas.....	73
2	Resultados.....	74
2.1	Alterações comportamentais induzidas pelo ECI e pelo tratamento com glibenclamida.....	74
2.1.1	Alterações de peso corporal, níveis séricos de glicose e peso da adrenal.....	74
2.1.2	Comportamento associado à depressão e locomoção.....	75
2.1.3	Comportamentos relacionados à ansiedade.....	77
2.1.4	Memória espacial.....	78

2.2	Alterações neuroquímicas.....	79
2.2.1	Níveis de caspase-1 e pró-caspase-1.....	79
2.2.2	Níveis de monoaminas.....	80
2.3	Alterações inflamatórias.....	82
3	Discussão.....	83

## **2. Estudo em humanos: Efeito do polimorfismo de troca única rs10754558 no gene do inflamassoma NLRP3, níveis séricos de interleucina-1 $\beta$ e prevalência do Transtorno Depressivo Maior .....**

		<b>89</b>
1	Métodos.....	91
1.1	Desenho do estudo e seleção dos participantes...	91
1.2	Coleta de amostra sangue.....	91
1.3	Genotipagem.....	92
1.4	ELISA.....	92
1.5	Análises estatísticas.....	93
2	Resultados.....	93
3	Discussão.....	97

## **Capítulo II: Envolvimento do imunorreceptor CD300f no Transtorno Depressivo Maior.....**

**102**

### **1. Estudo em roedores: A deleção genética do imunorreceptor CD300f induz alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao Transtorno Depressivo Maior.....**

**102**

1	Métodos.....	103
1.1	Animais.....	103
1.2	Análises comportamentais.....	104
1.2.1	Teste do campo aberto .....	104
1.2.2	Teste de suspensão pela cauda .....	105
1.2.3	Teste do nado forçado.....	105
1.2.4	Teste de borrifagem de sacarose.....	106

1.2.5	Teste de esconder esferas.....	106
1.3	Administração de lipopolissacarídeo.....	106
1.4	Tratamento farmacológico com bupropiona.....	107
1.5	Análises moleculares e bioquímicas.....	107
1.5.1	Expressão gênica por qPCR.....	107
1.5.2	ELISA.....	108
1.5.3	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	108
1.6	Análises estatísticas.....	109
2	Resultados.....	109
2.1	Alterações comportamentais em fêmeas de cinco meses de idade.....	109
2.1.1	Locomoção e habituação ao ambiente.....	109
2.1.2	Comportamento depressivo, motivacional e anedônico.....	110
2.1.3	Comportamentos relacionados à ansiedade.....	111
2.2	Alterações comportamentais em machos adultos de cinco meses de idade.....	112
2.3	Comportamentos associados à depressão e anedonia em fêmeas de dezoito meses de idade.....	114
2.4	Alterações neuroquímicas nas fêmeas CD300f-/-.....	116
2.4.1	Níveis hipocámpais de monoaminas.....	116
2.5	Alterações inflamatórias nas fêmeas CD300f/-..	118
2.5.1	Envolvimento da via do inflamassoma NLRP3...	118
2.5.2	Envolvimento de outras citocinas inflamatórias..	119
2.5.3	Efeitos comportamentais da administração de lipopolissacarídeo em fêmeas CD300f/-.....	120
3	Discussão.....	122



	<b>2. Estudo em humanos: Polimorfismo nos receptores CD300f e proteção contra o Transtorno Depressivo Maior em um estudo transversal de base populacional.....</b>	<b>127</b>
1	Métodos.....	127
1.1	Delineamento do estudo e participantes.....	127
1.2	Coleta de amostra de sangue.....	128
1.3	Genotipagem.....	128
1.4	ELISA.....	129
1.5	Análises estatísticas.....	130
2	Resultados.....	130
3	Discussão.....	135
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>142</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Transtorno depressivo maior: caracterização, epidemiologia e comorbidades

Os transtornos de humor são condições psiquiátricas duradouras e recorrentes com alta prevalência afetando milhões de pessoas no mundo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION *et al*, 2013; KESSLER e BROMET, 2013). Do ponto de vista clínico, estes transtornos incluem sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos, causam uma considerável morbidade psiquiátrica, perda da produtividade, além de serem fatores de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas, isquemia cerebral, doenças neurodegenerativas, entre outras (NEMEROFF e OWENS, 2002).

Os transtornos de humor são caracterizados principalmente por perturbações no humor e disfunção nos processos hedônicos, além de uma série de outros sintomas que podem variar entre os indivíduos e que podem ser desenvolvidos sob circunstâncias únicas (KRISHNAN e NESTLER, 2008). Neste contexto, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5 (DSM-5, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5*) classifica os transtornos de humor de acordo com a sintomatologia específica do paciente em: Transtorno disruptivo da desregulação do humor; Transtorno depressivo persistente (Distímia); Transtorno disfórico pré-menstrual; Transtorno depressivo induzido por substância/medicamento; Transtorno depressivo devido a outra condição médica; Outro transtorno depressivo especificado; Transtorno depressivo não especificado e o Transtorno Depressivo maior (TDM), que é o foco deste trabalho (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION *et al*, 2013).

O TDM, também conhecido como depressão maior ou apenas depressão é um dos subtipos de transtornos de humor mais estudados e com alta prevalência e incidência na população. Acredita-se que o TDM afeta 7% da população anualmente e 20% ao longo da vida (KESSLER e BROMET, 2013). Até o momento, seu diagnóstico é realizado através de uma entrevista clínica utilizando os critérios do DSM-5, onde o TDM é caracterizado pela presença de no mínimo 5 sintomas que são relatados pelo indivíduo dentro de um panorama de 9 possíveis sintomas, os quais devem estar presentes por um período mínimo de 2 semanas (Tabela 1). Para o diagnóstico de TDM, é necessário que dentre os 5 sintomas o indivíduo relate a presença de humor deprimido na maior parte do dia e/ou anedonia, caracterizada pela diminuição de

prazer e interesse nas atividades diárias (BENTLY, PAGALILAUAN e SIMPSON, 2014; AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, *et al.*, 2013; NEMEROFF, 2007).

**Tabela 1. Critério diagnóstico para o transtorno depressivo maior segundo o 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

**Legenda:** Sintomas presentes no TDM de acordo com o DSM-5. *TDM: Transtorno depressivo maior; DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5* (Adaptado de AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION *et al.*, 2013).

Em 1990 o TDM foi considerado como um desencadeador de demais patologias trazendo uma preocupação epidemiológica considerável, uma vez que se espera que sintomas depressivos possam afetar uma grande parte da população até o ano de 2020, contribuindo fortemente para os Anos Vividos com Incapacidade (YLD, do inglês: *Years Lived with Disability*) em países desenvolvidos e em desenvolvimento (VOS, *et al.*, 2015; MURRAY e LOPEZ, 1996). Considerando que os episódios depressivos estão fortemente associados a morbidades clínicas severas como doenças cardiovasculares (CHAUVET-GELINIER e BONIN, 2016; MAVRIDES e NEMEROFF, 2015), diabetes mellitus e obesidade (CHEN *et al.*, 2016; ONYIKE *et al.*, 2003), além de condições de dor crônica ou outras condições que apresentam um perfil inflamatório (PATTEN *et al.*, 2016), pode-se dimensionar o grau de impacto que o TDM pode causar no indivíduo, na sua família, e na sociedade.

Sabe-se que o impacto econômico geral causado pelo TDM é extremamente alto, sendo dividido pelos investigadores em “custos diretos”, que são aqueles gerados para tratar diretamente os sintomas do TDM e os “custos indiretos”, que avaliam o impacto secundário causado

na produtividade, morbidade e mortalidade, qualidade de vida, entre outros fatores (FOSTICK *et al.*, 2010). O TDM atingiu um gasto total de 83 bilhões de dólares no ano de 2000 nos Estados Unidos da América (GREENBERG *et al.*, 2003). No Brasil, os estudos do impacto econômico do TDM são mais escassos, contudo, foi demonstrado que o TDM gera um gasto médio de quase 6 mil dólares por pessoa ao ano, no que se refere ao desempenho prejudicado no trabalho e redução da produtividade (EVANS-LACKO e KNAPP, 2016). Contudo, não é apenas o tratamento e as consequências do TDM que são responsáveis por custos altíssimos para a sociedade. A falta de aderência ao tratamento farmacológico está associada a altos gastos econômicos, uma vez que um paciente que não termina corretamente o tratamento tem um aumento nas chances de recorrência dos episódios depressivos (HO *et al.*, 2016).

Além dos diversos pontos negativos acima citados, o TDM também está associado à redução na qualidade de vida dos indivíduos afetados e ao prejuízo psicossocial, levando ao mau funcionamento e aderência social, prejuízo na comunicação social, redução da percepção e das redes sociais (KUPFERBERG *et al.*, 2016). O impacto social negativo para o indivíduo é igual ou maior do que aquele gerado por algumas condições clínicas crônicas como a diabetes mellitus e a osteoartrite (HAYS *et al.*, 1995). Contudo, estudos demonstram que a qualidade de vida é significativamente recuperada principalmente na fase aguda do tratamento com fármacos antidepressivos (PAPAKOSTAS *et al.*, 2004).

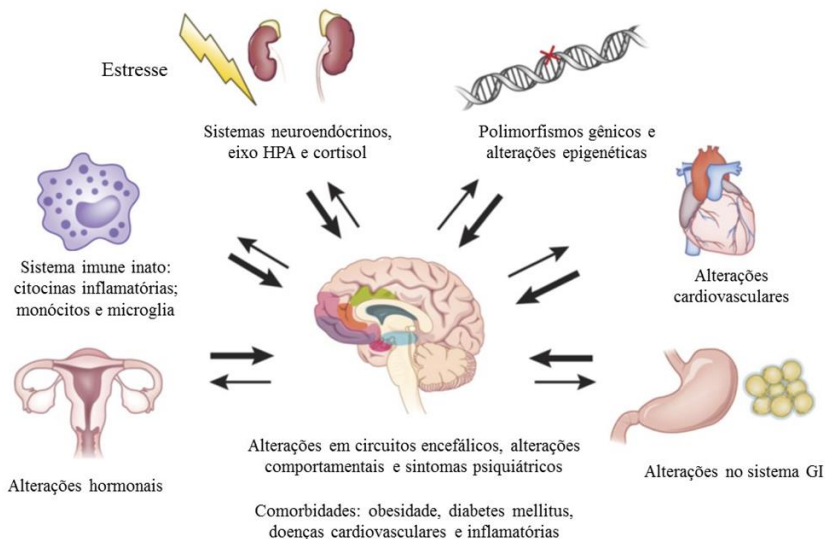
O TDM afeta duas vezes mais mulheres do que homens, que também reportam maior severidade de sintomas (HAY *et al.*, 2018; SCHUCH *et al.*, 2014; KORNSTEIN *et al.*, 2000). Um estudo de coorte realizado entre os anos de 1995-2013 na Dinamarca acompanhou 5.103.669 indivíduos e observou que nesta população as mulheres apresentaram um risco duas vezes maior de desenvolver o TDM comparado aos homens. A taxa de mortalidade associada ao TDM foi de 2,32 (IC: 2,30 – 2,35) para homens e 1,93 (IC: 1,92 – 1,95) para mulheres, e o TDM parece reduzir a expectativa de vida em 14,1 anos em homens e 10,1 anos em mulheres, considerando os indivíduos que foram diagnosticados aos 15 anos de idade (LAURSEN *et al.*, 2016). Contudo, outros fatores biológicos e sociais, incluindo o estigma, características diferentes do TDM entre homens e mulheres, e até mesmo a busca por diagnóstico e tratamento, podem influenciar esses dados de prevalência.

É evidente que o TDM é um problema de saúde global, sendo necessário um contínuo investimento em pesquisas, medidas de prevenção e tratamento, pois o tratamento farmacológico atual não é eficaz para 30 - 50% dos pacientes, apresentando muitos efeitos colaterais e início tardio de ação (GURURAJAN *et al.*, 2016). Essa discrepância na resposta dos pacientes ao tratamento farmacológico provavelmente ocorre porque o TDM é um transtorno heterogêneo e multifatorial, envolvendo múltiplas alterações fisiológicas, endócrinas e celulares, onde cada paciente parece apresentar uma combinação de mecanismos neuropatológicos únicos (DEAN e KESHAVAN, 2017). Ainda se têm pouca compreensão sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TDM, sabe-se que esta é uma condição multifatorial caracterizada por alterações em diversos circuitos encefálicos, múltiplos sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização (KRISHNAN e NESTLER, 2008; NEMEROFF e OWENS, 2002; NESTLER *et al.*, 2002). Atualmente sabe-se que o TDM está acompanhado de um aumento no risco cardiovascular (KAHL, WESTHOFF-BLECK e KRÜGER, 2017; VAN-AGTMAAL *et al.*, 2017), de alterações endócrinas diversas como nos níveis de cortisol, níveis de leptina e grelina associados com a síndrome metabólica e distúrbios de apetite, além de um risco aumentado para o desenvolvimento de diabetes mellitus (JOSEPH e GOLDEN, 2017; MARAZZITI *et al.*, 2014), alterações nos hormônios sexuais (WANG *et al.*, 2016), alterações gastrointestinais e na microbiota (MAYER *et al.*, 2014), alterações genéticas e epigenéticas variadas (CAPSI e MOFFITT, 2006) e alterações no sistema imunológico (IWATA *et al.*, 2013) (Figura 1).

Além das alterações fisiopatológicas que podem levar ao TDM, uma vez com o TDM o indivíduo possui maiores chances de desenvolver outras patologias agregando, desta forma, comorbidades ao transtorno (DUMAN *et al.*, 2016). Doenças cardíacas são as condições mais observadas em indivíduos com TDM quando comparados àqueles que não o têm, com risco relativo (RR) de 1,81 e intervalo de confiança 95% (IC 95%) de (1,53 - 2,15). Já as doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer [RR: 1,66 (IC 95%: 1,29-2,14)], doenças metabólicas como a diabetes mellitus [RR: 1,60 (IC 95%: 1,37-1,88)], a obesidade [RR: 1,58 (IC 95%: 1,33-1,81)] e até mesmo o câncer [RR: 1,29 (IC 95%: 1,14-1,46)] possuem um risco um pouco menor, mais ainda significativo de serem desencadeadas em indivíduos com TDM (OTTE *et al.*, 2016; PENNINX *et al.*, 2013). Além disso, em pacientes com TDM, a presença de uma, duas ou três doenças clínicas associadas aumenta em respectivamente 3,6, 6,4, e 14,9 vezes a chance de tentativa

de suicídio, sugerindo um agravamento dos sintomas psiquiátricos pela frequência das comorbidades (OH *et al.*, 2018).

**Figura 1: Heterogeneidade das alterações fisiopatológicas observadas no transtorno depressivo maior**



**Legenda:** A diversidade de sistemas envolvidos na patologia do TDM resulta em diversos determinantes para a heterogeneidade deste transtorno. Por outro lado, o TDM também leva a uma desregulação de muitos sistemas, estando associado a diversas comorbidades. Comumente se observa alterações no eixo HPA após um evento estressor concomitante com o aumento de cortisol. Adicionalmente, polimorfismos e alterações epigenéticas, como alterações no padrão de metilação do DNA, podem influenciar a expressão gênica e estar associados ao risco de desenvolver o TDM. Fatores de risco cardiovascular e alterações cardíacas como nos níveis de VEGF e outros fatores, alterações imunes como o aumento de citocinas pró-inflamatórias e células do sistema imune, alterações no sistema gastrointestinal e na composição da microbiota também são observadas. Além disso, existe uma desregulação hormonal nos níveis de grelina, leptina e hormônios sexuais, dentre eles a progesterona e a testosterona. Todas essas alterações podem estar associadas ao TDM em diferentes grupos de pacientes. *GI: Gastrointestinal; TDM: Transtorno depressivo maior; HPA: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal; VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular* (Adaptado de DUMAN *et al.*, 2016).

## 1.2. Estresse e alterações fisiopatológicas no transtorno depressivo maior

A manutenção da vida depende criticamente da capacidade do indivíduo manter seu *milieu* interno constante frente às adversidades do ambiente (BERNARD, 1965; HARRISON, 1951). Contudo, todos estão suscetíveis a enfrentar situações estressoras ao longo da vida, que são as situações que causam estresse. A palavra “estresse”, a qual refere-se com frequência, é definida como um processo de pressão ambiental crônica ou de intensidade superior à capacidade de adaptação de um organismo, exceto em indivíduos considerados resilientes, e resulta em uma demanda psicológica e em desafios biológicos que podem desencadear patologias (COHEN, KESSLER e GORDON, 1995). Existem três perspectivas sobre a definição de estresse, a saber (1) estresse ambiental: envolve as situações ou experiências ambientais relacionadas às demandas adaptativas substanciais; (2) estresse psicológico: diz respeito às avaliações pessoais subjetivas de suas habilidades em lidar com certas situações e experiências; e por fim o (3) estresse biológico: o qual enfatiza as funções dos sistemas fisiológicos de um organismo que são reguladas por condições psicológicas e físicas (SALLEH, 2008).

Estudos epidemiológicos relacionam eventos estressantes durante a vida como o principal fator ambiental envolvido na fisiopatologia do TDM (PLIEGER *et al.*, 2015; MONROE, SLAVICH e GEORGIADIS, 2009; STROUD, DAVILA e MOYER, 2008; HAMMEN, 2005). Aproximadamente 50-80% dos pacientes com TDM reportam a ocorrência de um evento estressor agudo ou crônico em sua vida antes de um episódio do transtorno (MONROE, SLAVICH e GEORGIADIS, 2009). Uma classe de eventos estressores altamente associada ao desencadeamento de episódios de depressão incluem eventos como o término de uma relação, uma perda financeira significativa, problemas graves de saúde, o término de um emprego, ou a rejeição e exclusão social (SLAVICH e IRIWN, 2014). Além disso, estudos epidemiológicos que têm como foco os eventos estressores na infância relacionados ao TDM na vida adulta mostram que situações como o abuso sexual, negligência psicológica, exposição à violência doméstica e separação da criança em relação aos pais estão relacionados a um maior risco, severidade e cronicidade do TDM (LI, D'ARCY e MENG, 2016). Um estudo de coorte de 14.062 mulheres grávidas com parto estimado entre 1º de abril de 1991 e 31 de dezembro de 1992 mostrou que o número de eventos estressores de vida estava associado a



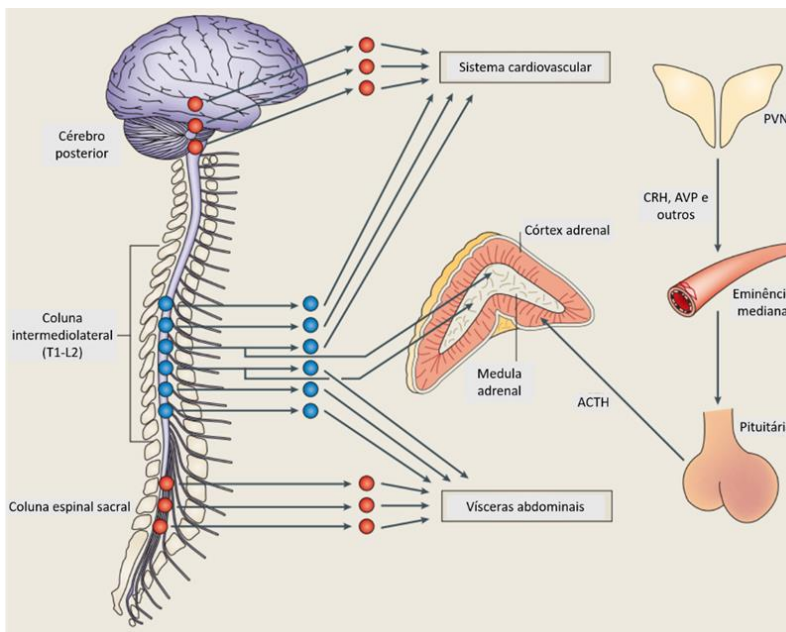
sintomas depressivos e ao diagnóstico de TDM na idade de 17 e 18 anos nos filhos, evidenciando que o impacto do estresse pode ocorrer de forma indireta na vida do indivíduo, não sendo ele o receptor primário do evento estressor (KINGSBURY *et al.*, 2016).

Em resposta aos eventos estressores, o organismo inicia respostas adaptativas que são constituídas por mudanças de curto prazo no sistema nervoso, cardiovascular, endócrino e imunológico (SELYE, 1956). Uma das principais respostas do organismo ao estresse é desencadeada pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso autônomo. O eixo HPA constitui um dos principais sistemas endócrinos que mantêm a homeostase quando o organismo é desafiado ou estressado, sendo a resposta ao estresse mais importante do ponto de vista endócrino (JURUENA, 2014). A ativação do eixo HPA pode ocorrer tanto em situações de estresse agudo (SCHNEIDERMAN, IRONSON e SIEGEL, 2005) quanto estresse crônico (CORYELL, 2006). Como pode ser observado na Figura 2, de forma geral, a ativação do eixo HPA por um fator estressante interno ou externo leva à liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH, do inglês *Corticotropin- Releasing Hormone*) pelos neurônios dos núcleos paraventriculares do hipotálamo. O CRH é secretado na circulação venosa porta e atinge a pituitária, ligando-se a receptores específicos e estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*) pelas células da pituitária anterior. O ACTH atinge a circulação sanguínea e atua nas glândulas adrenais levando à liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal, sendo o cortisol o principal glicocorticoide liberado pela espécie humana, enquanto a corticosterona é o principal glicocorticoide em outros animais, como os roedores (SMITH e VALE, 2006; JURUENA, CLEARE e PARIANTE, 2004; YOUNG, KWAK e KOTTAK, 1995). Em um contexto fisiológico, após exercerem diversas ações em vários tecidos, como o controle do metabolismo e dos processos inflamatórios, a ligação dos glicocorticoides em receptores localizados no hipotálamo, pituitária e no hipocampo exerce um mecanismo de inibição retrógrada diminuindo a ativação do eixo HPA quando o estressor ou ameaça se extingue, regulando tanto a duração quanto a magnitude do estresse na intenção de reestabelecer a homeostase (WALKER e SPENCER, 2018). Sob condições basais, o controle da secreção de glicocorticoides é realizada através dos receptores mineralocorticoides, enquanto sob situações estressantes e altas concentrações de cortisol, a inibição retrógrada é realizada pela ativação dos receptores de glicocorticoide no

hipocampo, hipotálamo e na glândula pituitária (JURUENA, 2014; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

Além disso, a ativação do sistema nervoso autônomo gera uma resposta imediata à exposição ao estressor através do sistema nervoso simpático, levando a liberação de adrenalina e noradrenalina pelas células da medula da glândula adrenal. A ativação simpática provoca alterações rápidas no organismo como um aumento na taxa de batimentos cardíacos e força da contração, vasoconstrição periférica e mobilização das reservas energéticas, além disso, o sistema nervoso simpático também projeta nervos para a glândula adrenal regulando a secreção de glicocorticoides (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009) e para a medula óssea, onde controla a diferenciação de células precursoras hematopoiéticas e a redistribuição e tráfego de células imunes para a corrente sanguínea (WOHLEB *et al.*, 2016; WOHLERB *et al.*, 2013).

**Figura 2: Eixo HPA e sistema nervoso autônomo na resposta ao estresse**



**Legenda:** O sistema simpático-adrenomedular e o eixo HPA são os sistemas primários na manutenção e reestabelecimento da homeostase em resposta ao estresse. A exposição ao estressor resulta na ativação dos neurônios simpáticos pré-ganglionares (mostrados em azul) na coluna intermediolateral (T1-L2) que projetam neurônios para os gânglios pré ou paravertebrais que por sua vez

projetam para os órgãos e células na medula adrenal. Essa ativação simpática representa a clássica resposta de “luta ou fuga” e resulta no aumento da liberação de adrenalina e noradrenalina levando a um aumento na taxa de batimentos e força da contração cardiovascular, vasoconstrição periférica e mobilização de energia. Já o sistema nervoso parassimpático (em vermelho) projeta seus nervos para núcleos localizados próximos ou no próprio órgão destino e levam geralmente a ações opostas ao sistema nervoso simpático. Em relação ao eixo HPA, quando em resposta a um estressor, os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam hormônios como o CRH, arginina e AVP na circulação porta da eminência mediana. Esses hormônios atingem a pituitária onde se ligam e levam a secreção do hormônio ACTH que age no córtex adrenal e leva a liberação de cortisol/corticosterona. Ademais, a adrenal também é inervada pelo sistema nervoso simpático, o qual também regula a secreção de glicocorticoides. *HPA: Hipotálamo-pituitária-adrenal; CRH: Hormônio liberador de corticotropina; AVP: Arginina vasopressina; ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico* (Adaptado de ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

Contudo, quando uma ameaça ou estressor é persistente ocorre a *hiperativação* do eixo HPA levando à liberação excessiva de glicocorticoides e falhas nos mecanismos de inibição retrógrada. Apesar de indispensáveis para a resposta do organismo ao estresse, o excesso de glicocorticoides associado à falha dos mecanismos que controlam sua síntese e liberação, pode resultar em um aumento da neurotoxicidade através de modificações no metabolismo celular, excitotoxicidade, inflamação e dano oxidativo (SATO *et al.*, 2010; MADRIGAL *et al.*, 2006).

Diferentes modelos animais de depressão induzida por estresse demonstram alterações no eixo HPA. Em um estudo com separação materna, a prole apresentou aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona (DANIELS *et al.*, 2009) e o mesmo efeito foi observado em animais submetidos ao isolamento social, que também apresentaram uma redução na quantidade de receptores glicocorticoides no hipocampo (LIU *et al.*, 2013). Adicionalmente, no modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) também se observou aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, CRH e ACTH acompanhados por um aumento no perfil inflamatório plasmático (LIU *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2008). Com relação aos estudos clínicos, evidências na literatura mostram que pacientes com TDM apresentam elevações nos níveis de cortisol (ZORN *et al.*, 2017; COWEN, 2002) e que estes níveis podem estar associados com um aumento na expressão dos transportadores de serotonina, o que explicaria a diminuição deste neurotransmissor na fenda sináptica

(TAFET *et al.*, 2001). Ainda, a hiperativação do eixo HPA é evidente em pacientes com TDM, demonstrando um aumento nos níveis de CRH e ACTH (VARGHESE e BROWN, 2001). Um aumento nos níveis de cortisol foi evidenciado mesmo durante a remissão de sintomas em mulheres com TDM quando comparado aos indivíduos controle (HOLSEN *et al.*, 2013). Contudo, apesar de uma grande parte dos pacientes com TDM apresentarem aumento nos níveis de cortisol, estudos de metanálise realizados mostram que esses achados variam significativamente em relação ao tamanho do efeito encontrado entre estudos individuais (LAMERS *et al.*, 2013; JURUENA e CLEARE, 2007).

### **1.3. O sistema imunológico no transtorno depressivo maior**

As respostas imunológicas são respostas defensivas básicas de todos os seres vivos, com a intenção de manter a homeostase, a integridade celular e a sobrevivência do hospedeiro (BUCHMANN, 2014). Historicamente o sistema imune é dividido em dois grandes braços. O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa do organismo que atua de maneira mais genérica, sendo observado em vertebrados e é o sistema imunológico único nos invertebrados. O sistema imunológico inato age uma vez identificada a presença de um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP, do inglês *Pathogen associated molecular pattern*) ou ao dano (DAMP, do inglês *Danger associated molecular pattern*), desencadeando a ativação de células de defesa que reconhecem esses padrões e induzem sinalizações e cascatas enzimáticas no intuito de eliminar o invasor e/ou reparar o dano (BOEHM e SWANN, 2014). Fazem parte deste sistema os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, *natural killer*, basófilos e eosinófilos e o sistema complemento (MURPHY, 2014).

Por outro lado, quando o sistema imunológico inato não é capaz de eliminar o dano ou patógeno, outro sistema imunológico é requisitado, o adaptativo. O sistema imunológico adaptativo tem como principal função atribuída a grande especificidade em reconhecer o patógeno e a capacidade de formação de memória em diversos tipos de linfócitos. Quando a resposta imunológica adaptativa é requisitada, além da atuação da resposta inata que já está em andamento para a eliminação do patógeno ou dano, entram em ação os linfócitos T e B, as células apresentadoras de antígenos e os anticorpos (MURPHY, 2014).

Ao sistema nervoso central (SNC) era concedido o errôneo conceito de ser um local privilegiado e não ativo imunologicamente, de

forma a ser isolado da periferia do organismo pela barreira hematoencefálica (BHE) e não possuir vasos linfáticos (LOUVEAU, HARRIS e KIPNIS, 2015; CARSON *et al.*, 2006). Contudo, avanços científicos ao longo dos anos vêm trazendo cada vez mais evidências de que o SNC é altamente ativo, possuindo respostas complexas que são majoritariamente baseadas em respostas imunológicas inatas (LAMPRON, ELALI e RIVEST, 2013). As células da microglia apresentam capacidade fagocítica e são consideradas a primeira linha de defesa no SNC (YIRMIYA, RIMMERMAN e RESHEF, 2015). Contudo, sabe-se que existe uma comunicação efetiva entre as respostas imunológicas periféricas e centrais (KAUFMANN *et al.*, 2017). Em 2015, LOUVEAU e colaboradores demonstraram a existência de vasos linfáticos no SNC, localizados sob os sinos durais e conectados aos linfonodos cervicais. Estes vasos expressam todos os marcadores moleculares das células endoteliais linfáticas, sendo capazes de conduzir fluido, mediadores inflamatórios e células imunes (LOUVEAU *et al.*, 2015). Devido a pequena meia-vida das células mielóides no sangue e em tecidos inflamados, a medula óssea precisa constantemente suprir a demanda dessas células para influenciar a atividade inflamatória sistêmica e local. Recentemente, HERISSON e colaboradores (2018) demonstraram que em modelos de isquemia e inflamação cerebral aguda, a medula óssea do crânio contribui significativamente para a produção de neutrófilos quando comparada a medula óssea da tíbia. Porém, o mais interessante desta descoberta é que as células mielóides migram através do cérebro inflamado por canais microscópicos que atravessam o córtex interno do crânio e conectam diretamente a cavidade da medula óssea do crânio com a dura-máter, contribuindo desta forma para as respostas inflamatórias (HERISSON *et al.*, 2018).

Entre os principais mediadores extracelulares envolvidos na resposta imunológica podemos destacar as citocinas, as quimiocinas, os fatores de crescimento, os eicosanóides, as proteínas do sistema complemento e alguns peptídeos (MURPHY, 2014). Destes, as citocinas são moléculas mediadoras que participam da resposta imunológica crônica e aguda via conexões de sinalização (TURNER *et al.*, 2014). Na periferia, as citocinas são liberadas por diversas células do sistema imunológico, mas também por células endoteliais e agem sob diferentes alvos, os quais estão resumidamente expostos na Tabela 2. As citocinas também podem ser classificadas quanto à sua resposta imunológica, por exemplo: (1) as citocinas que atuam na imunidade adaptativa e incluem ligantes das seguintes famílias de receptores: *Família de receptores de cadeia comum*  $\gamma$  [IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21], *Família de*

*receptores de cadeia comum  $\beta$  - CD131* [IL-3, IL-5 e o Fator estimulador de colônias de granulócitos], *Família de receptores de cadeia IL-2 $\beta$  compartilhada* [IL-2 e IL-15] e *Família de receptores compartilhados* [IL-13 (complexo IL-13R-IL-4R)]; (2) as citocinas que atuam na sinalização pró-inflamatória e incluem ligantes das seguintes famílias de receptores: *Família de receptores IL-1* [IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-RA, IL-37 e IL-1Hy2], *Família de receptores IL-6* [IL-6, IL-11, IL-31, Fator neurotrófico ciliar, Cardiotrofina-1, Fator inibidor de leucemia, Osteopontina e Oncostatina M], *Família de receptores TNF- $\alpha$*  [Fator de necrose tumoral- $\alpha$ , Fator de necrose tumoral- $\beta$ , BAFF e APRIL], *Família de receptores IL-17* [IL-17A-F e IL-25 (IL-17E)], *Família de receptores de interferon tipo I* [Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$ , Interferon- $\omega$ , Interferon- $\kappa$  e Limitina], *Família de receptores de interferon tipo II* [Interferon- $\gamma$ ], *Família de receptores de interferon tipo III* [Interferon- $\lambda$ 1 (IL-29), Interferon- $\lambda$ 2 (IL-28A) e Interferon- $\lambda$ 3 (IL-28B)]; (3) as citocinas que atuam na sinalização anti-inflamatória e incluem ligantes das seguintes famílias de receptores: *Família de receptores IL-12* [IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35] e *Família de receptores IL-10* [IL-10, IL-19, IL-20, IL22, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29] (TURNER *et al.*, 2014).

No SNC, as citocinas funcionam como neuromoduladores que atuam regulando o neurodesenvolvimento, a transmissão sináptica e a neuroinflamação. Além disso, essas moléculas também são cruciais para a função imunológica central, atuando na vigilância, na facilitação do tráfego de leucócitos para o parênquima encefálico e no recrutamento de outros fatores inflamatórios (TAKESHITA e RANSOHOFF, 2012). Sob determinados estímulos tanto as células imunológicas quanto as próprias células do SNC produzem citocinas. As células da microglia, os astrócitos, os oligodendrócitos, as células mielinizantes do SNC e as células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP), as células endoteliais da microvasculatura cerebral e até mesmo os neurônios são capazes de produzir e secretar essas moléculas neuromoduladoras que vão atuar de maneira parácrina e autócrina através da ligação à receptores específicos (RAMESH, MACLEAN e PHILIPP, 2013).

**Tabela 2. Ação das citocinas, definidas pela célula-alvo e suas funções primárias**

Funções das citocinas. Ação das citocinas, definidas pela célula-alvo e suas funções primárias			
Citocina	Principal fonte	Célula-alvo	Principal função
<b>Interleucinas</b>			
<b>IL-1</b>	Macrófagos, células B e T, células dendríticas	Células B e T, células Natural killer	Piogênica, pró-inflamatória, proliferação e diferenciação, proliferação de células da medula óssea
<b>IL-2</b>	Células T	Células B e T ativadas, células Natural killer	Proliferação e ativação
<b>IL-3</b>	Células T, células Natural Killer	Células-tronco	Proliferação e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas
<b>IL-4</b>	Células T helper	Células B e T, macrófagos	Proliferação de células B e T citotóxicas, aumenta a expressão de MHC de classe II, estimula produção de IgG e IgE
<b>IL-5</b>	Células T helper	Eosinófilos, células B	Proliferação e maturação, estimula a produção de IgA e IgM
<b>IL-6</b>	Células T helper, macrófagos, fibroblastos	Células B ativadas, células plasmáticas	Diferenciação em células plasmáticas, produção de IgG
<b>IL-7</b>	Células estromais da medula óssea, células epiteliais	Células-tronco	Fatores de crescimento de células B e T
<b>IL-8</b>	Macrófagos	Neutrófilos	Quimiotaxia, pró-inflamatória
<b>IL-9</b>	Células T	Células T	Crescimento e proliferação
<b>IL-10</b>	Células T	Células B, macrófagos	Inibição da produção de citocinas e da função de células mononucleares, anti-inflamatória
<b>IL-11</b>	Células estromais da medula óssea	Células B	Diferenciação, induz proteínas de fase aguda
<b>IL-12</b>	Células T	Células Natural Killer	Ativação de células Natural Killer
<b>Fatores de necrose tumoral</b>			
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Macrófagos	Macrófagos	Citotoxicidade tumoral, caquexia
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	Monócitos, células T	Fagócitos, células tumorais	Quimiotaxia, fagocitose, oncostática, induz outras citocinas
<b>Interferons</b>			
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Leucócitos	Vários	Anti-tumoral
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	Fibroblastos	Vários	Anti-tumoral, anti-proliferativo
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Células T	Vários	Anti-tumoral, ativação de macrófago, aumenta função de neutrófilos e monócitos, induz a expressão de MHC de classe I e II nas células
<b>Fatores estimuladores de colônia</b>			
<b>G-CSF</b>	Fibroblastos, endotélio	Células-tronco e medula óssea	Produção de granulócitos
<b>GM-CSF</b>	Células T, macrófagos, fibroblastos	Células-tronco	Produção de granulócitos, eosinófilos e monócitos
<b>M-CSF</b>	Fibroblastos, endotélio	Células-tronco	Produção e ativação de monócitos
<b>Eritropoetina</b>	Endotélio	Células-tronco	Produção de células sanguíneas
<b>Outros</b>			
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Células B e T	Células T e B ativadas	Inibição da proliferação de células B e T, inibição da hematopoiese, promoção da cicatrização de feridas

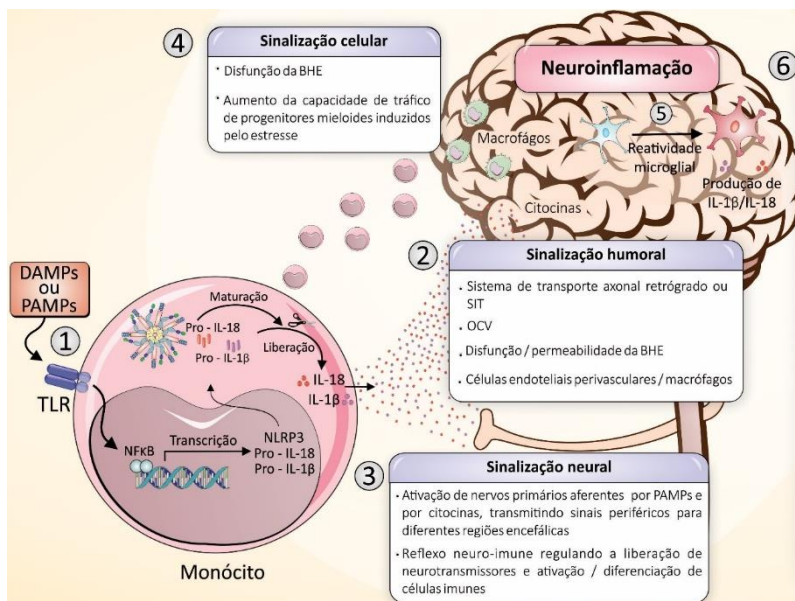
**Legenda:** Funções e ações das citocinas. *IL:* Interleucina; *TNF:* Fator de necrose tumoral; *IFN:* Interferon; *G-CSF:* Fator estimulante de colônia de granulócitos; *GM-CSF:* Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos; *M-CSF:* Fator estimulante de colônia de macrófagos (Adaptado de TURNER *et al.*, 2014).

A comunicação bidirecional entre o sistema imunológico e o SNC pode ocorrer por diversos mecanismos, os quais estão resumidamente ilustrados na Figura 3 (KAUFMANN, *et al.*, 2017; MILLER, MALETIC e RAISON, 2009). Através da sinalização humoral, as citocinas periféricas podem ter acesso ao SNC por transportadores de influxo (SIT, do inglês *saturable influx transporter*) ou pelo sistema de transporte axonal retrógrado, entrando neste através dos órgãos circunventriculares ou pela BHE permeável ou rompida. Adicionalmente, as células endoteliais perivasculares ou os macrófagos circulantes podem secretar citocinas que podem adentrar o SNC por difusão (WOHLEB *et al.*, 2013; DANTZER *et al.*, 2008). Na sinalização neural, PAMPs e citocinas podem ativar os neurônios aferentes, como o nervo vago, pois eles expressam receptores para citocinas e receptores do tipo toll (TLR). Uma vez ativados, os nervos aferentes levam os sinais periféricos do sistema imunológico para o SNC, onde geram uma resposta em diversas áreas que regulam o humor.

Um reflexo central-imune ativa os nervos autonômicos que liberam dopamina, acetilcolina e noradrenalina que podem controlar a diferenciação e atividade das células imunológicas periféricas. Projeções do sistema nervoso simpático para a medula óssea são estimuladas pelo estresse e controlam a diferenciação e redistribuição de células precursoras hematopoiéticas e de células imunes para o sangue (WOHLEB *et al.*, 2016; WOHLEB *et al.*, 2013). Na sinalização celular, monócitos periféricos ativados podem cruzar ou se infiltrar pela BHE gerando uma resposta no SNC (KAUFMANN *et al.*, 2017; WOHLEB *et al.*, 2013). Outrossim, a recente descoberta da presença de vasos linfáticos no SNC e de pequenos canais microscópicos no crânio que conectam a medula óssea com a dura-máter deve elucidar grande parte desta comunicação bidirecional (HERISSON *et al.*, 2018; LOUVEAU *et al.*, 2015).



### Figura 3: Mecanismos de comunicação bidirecional das respostas inflamatórias



**Legenda:** A comunicação bidirecional entre o sistema imunológico e o SNC pode ocorrer por diversos mecanismos: (1,2) Via humoral: A ativação de células imunes periféricas por DAMPs ou PAMPs leva a produção de moléculas inflamatórias que são secretadas pelas células e acessam o SNC (3) Via neural: PAMPs e citocinas periféricas ativam nervos primários aferentes levando a uma resposta no SNC ou um reflexo neuroimune regula a liberação de neurotransmissores e ativação e diferenciação de células imunes (4) Via celular: monócitos periféricos ativados atravessam a BHE. Todos esses mecanismos levam a um aumento na neuroinflamação. *SNC: Sistema nervoso central; PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógeno; BHE Barreira hematoencefálica; IL-1β: Inteleucina-1β; IL-18: Interleucina-18; SIT: Transportadores de influxo, OCV: Órgãos circunventriculares* (Adaptado de KAUFMANN *et al.*, 2017).

Desta maneira o sistema imunológico periférico é capaz de gerar ou exacerbar uma resposta no SNC. Contudo, esta é uma via de mão-dupla, e de maneira contrária, uma resposta primariamente gerada no SNC pode levar a alterações periféricas (IWATA *et al.*, 2013). Sabe-se que o estresse psicológico evoca uma resposta imunológica na ausência de dano tecidual ou patógenos, essa resposta é conhecida como inflamação estéril e pode ser muito danosa para a saúde física e mental

(FLESHNER, FRANK e MAIER, 2016). Porém, o impacto do estresse na resposta imunológica e seu envolvimento na etiologia do TDM ainda precisa ser melhor elucidado.

Na resposta ao estresse e no TDM existe uma exacerbação das respostas do sistema imunológico tanto inato quanto adaptativo. SMITH (1991) postulou a “teoria macrofágica da depressão”, a qual traz a hipótese de que a depressão está acompanhada de uma secreção exacerbada de citocinas pelos macrófagos, o que levaria ao surgimento dos sintomas. Esta teoria também explica a associação entre o TDM e outras doenças que possuem um perfil inflamatório (SMITH, 1991). De fato, esta hipótese tem sido confirmada em diversos modelos pré-clínicos de estresse crônico, onde foi demonstrada uma exacerbação evidente da produção e liberação de células mielóides, como os monócitos e granulócitos, sendo que este perfil associado ao estresse torna os monócitos periféricos circulantes mais inflamatórios (WHOLEB *et al.*, 2014). Além disso, alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são frequentemente encontradas em pacientes com TDM (SYED *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2017; PANDEY, 2017; GAZAL *et al.*, 2015; MOTA *et al.*, 2013). A exposição a um estresse agudo também é capaz de induzir um aumento precoce e mobilização de células imunológicas como neutrófilos, células T helper (Th), células T citotóxicas e linfócitos B na corrente sanguínea (DHABHAR *et al.*, 2012), demonstrando vigorosamente o envolvimento do sistema imunológico em transtornos psiquiátricos como o TDM.

Interessantemente, se pensarmos em situações de estresse que nos remetem à evolução e aos desafios enfrentados pela espécie humana ao longo do tempo como as *ameaças físicas históricas*, por exemplo ao fugir de um predador, um sistema fisiológico de alto desempenho deve ser ativado para nos preparar para tal ameaça (SCHNEIDERMAN, IRONSON e SIEGEL, 2005). Atualmente, situações ameaçadoras como as que a espécie humana enfrentou no passado já não são mais tão comuns. Por outro lado, estamos constantemente sujeitos a eventos estressores da modernidade, que são as *ameaças sociais contemporâneas*. Ambas desencadeiam um mecanismo fisiológico levando à ativação de uma resposta transcricional conservada frente a adversidades (CTRA, do inglês *Conserved Transcriptional Response to Adversities*), caracterizada por aumentar a expressão de genes pró-inflamatórios e diminuir a expressão de genes envolvidos na resposta antiviral inata de interferon tipo I, sendo que esta resposta leva a um

risco elevado do indivíduo desenvolver doenças inflamatórias ou adquirir infecções virais (FREDRICKSON *et al.*, 2015).

A resposta CTRA tem uma contribuição do sistema nervoso simpático, que permite ao SNC comunicar-se com o sistema imunológico periférico através da liberação de noradrenalina, que age nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ativando e guiando as células imunológicas para um fenótipo pró-inflamatório (POWELL *et al.*, 2013). Por outro lado, a resposta CTRA também leva à hiperativação do eixo HPA. Inicialmente os glicocorticoides atuam na supressão da transcrição de genes pró-inflamatórios, contudo, em situações exacerbadas ou crônicas de estresse uma dinâmica diferente é observada e encontra-se um perfil pró-inflamatório ao invés de anti-inflamatório (SLAVICH e IRWIN, 2014; IWATA *et al.*, 2013). De fato, o fenômeno de exacerbação da resposta inflamatória ocorre quando as células imunológicas se tornam menos sensíveis e resistentes aos efeitos dos glicocorticoides (COHEN *et al.*, 2012; BARNES e ADCOCK, 2009; CHROUSOS *et al.*, 1996). Estudos realizados demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias diminuem a expressão do receptor de glicocorticoide nas células imunológicas, bloqueiam a sua translocação para o núcleo e desfazem a ligação do receptor de glicocorticoide com o DNA através de interações proteína-proteína diminuindo assim sua função anti-inflamatória (PACE e MILLER, 2009). Além disso, o excesso de glicocorticoides foi demonstrado ser capaz de realizar uma sensibilização do inflamassoma NLRP3 (família de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3, um complexo sinalizador capaz de induzir a maturação de citocinas pró-inflamatórias), que com um estímulo subsequente pode potencializar a resposta inflamatória central e periférica (FRANK, WATKINS e MAIER, 2015; FRANK *et al.*, 2014; BUSILLO, AZZAM e CIDLOWSKI, 2011). Desta forma, o excesso de glicocorticoides juntamente com um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias potencializa a inflamação e está intimamente associado a alterações comportamentais e neuroquímicas observadas no TDM. Além do aumento de cortisol em pacientes com TDM ou corticosterona em modelos animais de depressão, se observa claramente um aumento de moléculas pró-inflamatórias como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e um aumento na ativação microglial e infiltração de monócitos no encéfalo. Também é claramente observado um aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína C reativa, tráfego de monócitos e granulócitos no sangue durante o TDM (WHOLEB *et al.*, 2016; IWATA *et al.*, 2013; MILLER, MALETIC e RAISON, 2009).

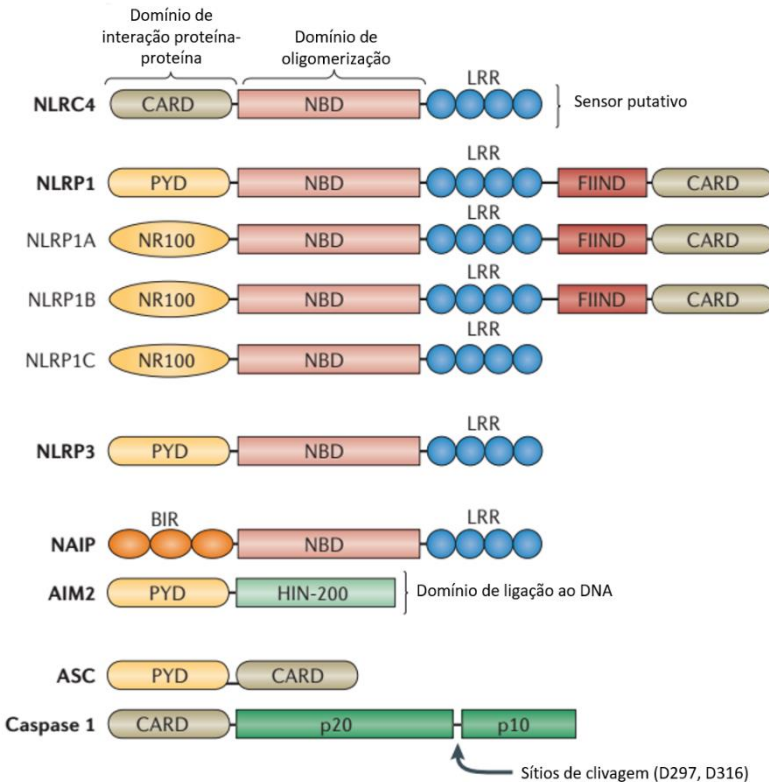
#### 1.4. O inflamassoma NLRP3 no transtorno depressivo maior

O inflamassoma é um complexo proteico solúvel localizado no citoplasma das células que tem como função a ativação de caspases, especialmente a caspase-1, que por sua vez, pode clivar e ativar as formas precursoras das interleucinas IL-1 $\beta$  e interleucina-18 (IL-18) em suas formas ativas, induzindo ou potencializando a resposta inflamatória (GURUNG, LUKENS e KANNEGANTI, 2014; WALSH, MURUVE e POWER, 2014; HALLE *et al.*, 2008). O complexo inflamassoma está presente em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema imune periférico e células do SNC como nos neurônios e microglia (ALCOCER-GOMEZ *et al.*, 2014; LAMKANFI e DIXIT, 2014; PAN *et al.*, 2014). Em geral, os complexos inflamassomas possuem três componentes principais: um receptor de reconhecimento padrão citosólico (PRR, do inglês *Pattern Recognition Receptor*); uma enzima caspase-1; e uma proteína adaptadora ASC (*Adaptor apoptosis-associated speck-like protein Containing a CARD*) com papel de facilitar a interação entre o PRR e a caspase-1 (WALSH, MURUVE e POWER, 2014).

Existem diversos tipos de inflamassomas centrados em diferentes membros da família de receptores semelhantes ao NOD (NLRs, do inglês *Nucleotide-binding Oligomerization Domain – Like Receptors*) como PRR, sendo que até o momento 22 genes em humanos para os NLRs foram identificados, contudo, apenas alguns destes formam complexos oligoméricos que resultam na ativação de caspases (ABAIS *et al.*, 2014). Os NLRs possuem três domínios: um domínio repetido rico em leucina (LRR, do inglês *Leucine Rich Repeat*) carboxi-terminal; um domínio de nucleotídeo central denominado NATCH; e na porção amino-terminal, um domínio de interação variável que poderá ser um domínio de pirina (PYD, do inglês *Pyrin domain*), um domínio de recrutamento de caspase (CARD, do inglês *Caspase activation and recruitment domain*) ou um domínio repetitivo inibidor de baculovírus (BIR, do inglês *Baculovirus apoptosis inhibitory repeat*) (KIGERL *et al.*, 2014; LAMKANFI e DIXIT, 2014; WALSH, MURUVE e POWER, 2014) (Figura 4). Em relação aos NLRs com domínios PYD, o inflamassoma NLRP3 é o mais bem estudado e amplamente implicado na ativação da caspase-1 (WALSH, MURUVE e POWER, 2014). O NLRP3 interage com a proteína adaptadora ASC através do domínio PYD presente tanto no NLR como na ASC. Por outro lado, a caspase-1 interage com a proteína adaptadora ASC através do domínio CARD,

presente em ambas, e assim forma-se um complexo multiproteico. No SNC grande atenção tem se dado ao inflamassoma NLRP1 que foi evidenciado em neurônios, Ausente em melanoma-2 (AIM2, do inglês *Absent in melanoma-2*) que embora não seja um NLR está presente em neurônios e é capaz de formar um complexo inflamassoma e reconhecer dupla-fita de DNA, NLRC4 demonstrado em microglia e macrófagos sendo capaz de detectar patógenos derivados de bactérias, NLRP2 evidenciado em astrócitos e o próprio NLRP3 presente em microglia (KAUFMANN *et al.*, 2017; DE RIVERO VACCARI, DIETRICH e KEANE, 2014; WALSH, MURUVE e POWER, 2014; MINKIEWICZ, RIVERO VACCARI e KEANE, 2013).

**Figura 4: Componentes do inflamassoma e domínios estruturais**

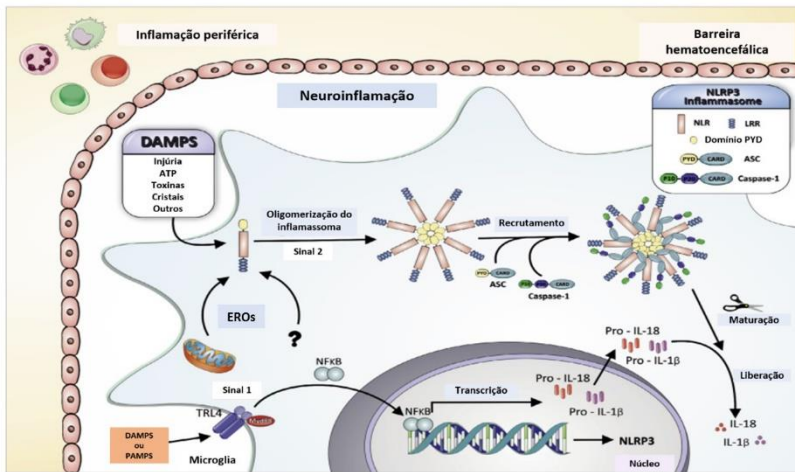


**Legenda:** A formação dos complexos multiproteicos é determinada por diversos componentes. Nos NLRs, o componente sensor é formado pela região LRR. A oligomerização dos NLRs é mediada pelo domínio de ligação à nucleotídeos (NBD). O domínio de pirina (PYD) medeia interações proteína-proteína entre o sensor do inflamassoma e a proteína adaptadora ASC, a qual também contém um domínio de PYD. A porção CARD da ASC medeia interações proteína-proteína com a porção CARD da pró-caspase-1. O NLRP4 e o NLRP1 podem interagir diretamente com a pró-caspase-1 através dos seus domínios CARD. Os inflamassomas NLRP1A-C estão presentes em roedores e em vez de um domínio de PYD como no NLRP1 possuem um domínio NR100. Os NAIPs são uma subfamília dos NLRs e contêm um domínio BIR. No inflamassoma AIM2 o domínio de ligação de DNA (HIN-200) é o componente sensor e o domínio de PYD medeia a interação com a ASC. *NLRs: Receptores do tipo NOD; LRR: Domínio carboxi-terminal rico em leucina; NBD: Domínio de ligação a nucleotídeos; ASC: Adaptor apoptosis-associated Speck-like*

*protein Containing a CARD; CARD: Domínio de recrutamento de caspase; NR100: Domínio amino-terminal do NLRP1 de roedores com 100 aminoácidos; NAIPs: Proteínas inibidoras da apoptose neuronal; BIR: domínio repetitivo inibidor de baculovírus* (Adaptado de: WALSH, MURUVE e POWER, 2014).

Durante uma resposta desencadeada por um dano tecidual ou por patógenos, a inflamação é induzida quando há o reconhecimento de PAMPs, que consistem em moléculas conservadas derivadas de patógenos, ou DAMPs, que são moléculas próprias e endógenas liberadas em resposta a um sinal de estresse, dano ou morte celular (WALKER *et al.*, 2014; LAMKANFI e DIXIT, 2012). A ativação do complexo NLRP3 ocorre por uma grande variedade de estímulos, e em geral requer dois sinais (Figura 5) (GURUNG, LUKENS e KANNEGANTI, 2014). O primeiro sinal ocorre via TLR que também é considerado um PRR. A família dos TLRs está presente na membrana plasmática e endossomal, podendo assim, detectar PAMPs e DAMPs presentes no espaço extracelular (LAMKANFI e DIXIT, 2012). Este sinal via TLRs, com exceção do TLR-3, induz uma sinalização intracelular que leva ao recrutamento da proteína adaptadora MyD88 (do inglês, *Myeloid Differentiation primary response 88*) que recruta e ativa outros fatores levando, por fim, a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, do inglês *Nuclear Factor Kappa B*) e a transcrição dos genes que codificam as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18, além do próprio inflamassoma NLRP3 (CHOI e RYTER, 2014; KIGERL *et al.*, 2014; TSUCHIYA e HARA, 2014; HANAMSAGAR, HANKE e KIELIAN, 2012; BAUERNEFEIND *et al.*, 2009). Então, um segundo sinal é necessário para que os NLRs formem um oligômero definido, capaz de recrutar a proteína adaptadora ASC, que com seu domínio CARD irá recrutar uma pró-caspase-1, que será ativada por auto-proteólise formando a caspase-1, e essa união de proteínas forma uma partícula sinalizadora, o inflamassoma (LECHTENBERG, MACE e RIEDL, 2014; SINGHAL *et al.*, 2014; PROELL *et al.*, 2013). Uma vez que o inflamassoma está montado e a caspase-1 está ativada, há a conversão das pró-formas de IL-1 $\beta$  e IL-18 nas formas ativas (SINGHAL *et al.*, 2014), iniciando desta maneira, uma resposta inflamatória.

**Figura 5: Sinalização mediada pelo inflamassoma NLRP3**



**Legenda:** A ativação do inflamassoma depende de dois sinais. Primeiramente ocorre o reconhecimento de DAMPs ou PAMPs pelos receptores TLRs, comumente pelo TLR-4, o qual induz uma sinalização intracelular nas células microgлияis levando à ativação e translocação do fator de transcrição NF-κB para o núcleo onde ele estimula a transcrição dos genes das formas imaturas de IL-1β e IL-18 e os próprios componentes do inflamassoma. Um segundo sinal, que podem ser DAMPs, EROs ou outros estímulos não conhecidos, são necessários para induzir a oligomerização dos NLRs 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-1β e IL-18 em interleucinas maduras que são liberadas e podem atuar como mediadores pró-inflamatórios. *DAMPs: Padrões moleculares associados ao dano; PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos; TLRs: Receptores do tipo Toll; NFκB: Fator nuclear kappa B; IL-1β: Interleucina-1β; IL-18: Interleucina-18, EROs: Espécies reativas de oxigênio* (Adaptado de KAUFMANN *et al.*, 2017).

Os sinais que levam a união dos componentes do inflamassoma NLRP3 ainda são pouco elucidados. PAMPs como vírus, parasitas e bactérias, além de diversos DAMPs foram indicados como ativadores do inflamassoma, assim como o efluxo de K<sup>+</sup> causado pela ativação dos receptores de adenosina trifosfato (ATP) do subtipo P2X7 (MARIATHASAN *et al.*, 2006), cristais de sílica (HORNUNG *et al.*, 2008), de ureia (MARTINON *et al.*, 2006) e o peptídeo β-amiloide (HALLE *et al.*, 2008). Além disso, a sinalização mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) e o excesso de glicocorticoides também



parecem estar envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 (FRANK, WATKINS e MAIER, 2015; ALFONSO-LOECHES *et al.*, 2014; FRANK *et al.*, 2014; GURUNG, LUKENS e KANNEGANTI, 2014; HARIJITH, EBENEZER e NATARAJAN, 2014; BUSILLO, AZZAM e CIDLOWSKI, 2011). Contudo, ainda não está claro se apenas uma via de sinalização pode ativar o inflamassoma NLRP3 ou se múltiplas vias de sinalização cooperam para sua ativação (TSUCHIYA e HARA, 2014). A grande diversidade de estímulos que pode levar à ativação do inflamassoma NLRP3 sugere um importante papel como sensor de dano celular e estresse, eventos envolvidos em uma série de patologias incluindo o TDM (WALSH, MURUVE e POWER, 2014; IWATA *et al.*, 2013).

Estudos clínicos e pré-clínicos mostram que o TDM está acompanhado por um desbalanço no perfil inflamatório, caracterizado em geral, por um aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de citocinas anti-inflamatórias (MOTA *et al.*, 2013; HAYLEY, 2011; DOWLATI *et al.*, 2010; HENRY *et al.*, 2009). Em especial, a IL-1 $\beta$  tem sido alvo de diversas investigações ao longo dos anos e é indicada como um passo importante na resposta pró-inflamatória na patologia do TDM (IWATA *et al.*, 2013). Níveis aumentados de IL-1 $\beta$  já foram identificados no soro de pacientes com TDM (MOTA *et al.*, 2013; DOWLATI *et al.*, 2010; HOWREN *et al.*, 2009). Além disso, KOO e DUMAN (2008) mostraram que o bloqueio de IL-1 $\beta$  inibe os comportamentos depressivos induzidos por um modelo de ECI em camundongos (KOO e DUMAN, 2008). A IL-18, outra citocina pró-inflamatória, apresentou níveis aumentados no soro de pacientes com TDM quando comparados aos indivíduos controles e em modelos animais de depressão (SYED *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2010; KROES *et al.*, 2006; KOKAI *et al.*, 2002).

Os receptores TLRs estão presentes tanto periféricamente quanto no SNC, sendo expressos pela microglia e diversos TLRs já foram reportados em neurônios (KIGERL *et al.*, 2014). Dentre os TLRs, o receptor TLR-4 é essencial para o reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS), além de reconhecer uma variedade de condições estressantes, moléculas danosas e morte por necrose (TAKEDA, KAISHO e AKIRA, 2003). A presença e sinalização por estes receptores na patologia do TDM tem sido evidenciada (LIU, BUISMAN-PIJLMAN e HUTCHINSON, 2014). O aumento na expressão do TLR-4 foi observado no cérebro de ratos submetidos a um modelo de depressão induzida por estresse crônico (GÁRATE *et al.*, 2011) e em um modelo de estresse agudo, onde o tratamento com

inibidor de TLR-4 (TAK-242) preveniu os efeitos do estresse (GÁRATE *et al.*, 2014). Além disso, pacientes com TDM apresentaram expressão elevada de TLR-4 nas células mononucleares, efeito revertido pela psicoterapia (KÉRI *et al.*, 2014).

Estudos recentes apontam para o envolvimento do inflamassoma NLRP3 na patologia do TDM, visto que, as citocinas inflamatórias controladas pelo inflamassoma estão aumentadas neste transtorno (SYED *et al.*, 2018; SINGHAL *et al.*, 2014; ALCOCER-GÓMEZ e CORDERO, 2014; IWATA *et al.*, 2013). O aumento da expressão do inflamassoma NLRP3 e dos componentes da via do NF- $\kappa$ B foram observados no córtex de ratos expostos ao estresse crônico, principalmente na microglia, efeitos que foram revertidos pelo tratamento com fluoxetina (PAN *et al.*, 2014). Ainda, ZHANG e colaboradores (2014), mostraram que a administração de LPS causou um comportamento depressivo associado a um aumento na expressão do inflamassoma NLRP3 e de IL-1 $\beta$ , efeitos revertidos pelo inibidor de caspase-1 (Ac-YVAD-CMK). No mesmo contexto, o uso de um inibidor específico para o inflamassoma (VX-765) também diminuiu a ativação do NLRP3 e o comportamento depressivo (ZHANG *et al.*, 2014). Os estudos farmacológicos de inibição do inflamassoma NLRP3 na patologia da depressão foram posteriormente confirmados pelo uso de animais nocautes para o inflamassoma NLRP3, o qual não apresentou comportamento depressivo, anedônico e disfunção social após protocolos de estresse, além de menores níveis de IL-1 $\beta$  e ativação microglial no hipocampo (SU *et al.*, 2017; ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2016; IWATA *et al.*, 2016). Além disso, animais nocautes para o inflamassoma NLRP3 e tratados repetidamente com LPS não apresentaram comportamento alterado no teste do nado forçado (TNF) (WICKENS *et al.*, 2017). Em estudos clínicos foi observado que pacientes com TDM apresentaram expressão aumentada de NLRP3 e de caspase-1 e maiores níveis séricos de IL-1 $\beta$  quando comparados com o grupo controle, e que o tratamento com antidepressivos reverteu esses parâmetros (ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2017; ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2014). Também, pacientes diagnosticados com TDM nunca tratados apresentaram aumento periférico nas proteínas do inflamassoma NLRP3 comparados aos controles saudáveis (SYED *et al.*, 2018).

Têm-se observado que polimorfismos no gene que codifica a proteína NLRP3, o qual está na localização 1q44 do genoma, estão associados a diversas patologias de cunho inflamatório. O SNP rs10754558 (C/G), particularmente, foi identificado na região 3'UTR do exon 11 e foi analisado quanto à sua funcionalidade. HITOMI e

colaboradores (2009), através do ensaio da luciferase em uma linhagem de células mieloides humanas (THP-1) transfectadas com as variantes gênicas deste polimorfismo, verificaram que o alelo ancestral G está associado a uma alta estabilidade do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do NLRP3. Os constructos que tinham o alelo G do polimorfismo rs10754558 possuíam 1,3 vezes mais atividade da luciferase do que os constructos que tinham o alelo C. Além disso, um teste realizado em monócitos periféricos humanos de doadores saudáveis que possuíam heterozigose para o polimorfismo rs10754558 (C/G), demonstrou que ter o alelo G aumentou a expressão do RNAm de NLRP3 em 1,5 vezes (HITOMI *et al.*, 2009). De fato, o alelo G do polimorfismo rs10754558 é considerado de risco e está associado a diversas doenças como diabetes mellitus tipo-2 (WANG *et al.*, 2015), colite ulcerativa (ZHANG *et al.*, 2014), doença arterial coronariana (ZHOU *et al.*, 2016), artrite reumatóide (ADDOBBATI *et al.*, 2018) doenças autoimunes (LEE e BAE, 2016), obesidade e resistência à insulina (RHEINHEIMER *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016).

Com relação a patologias do SNC, um estudo realizado recentemente avaliou a associação entre a frequência alélica do polimorfismo rs10754558 em indivíduos com a doença de Alzheimer comparado a controles saudáveis (TAN *et al.*, 2013). Neste estudo, não foram observadas diferenças entre os indivíduos com ou sem a doença em relação a frequência do alelo G (de risco). Contudo observou-se que quando o indivíduo é portador do alelo de risco para o NLRP3 e do alelo de risco para APOE  $\epsilon$ 4 (apolipoproteína E) as chances de ter a doença de Alzheimer aumentam. Além disso, a análise de regressão logística demonstrou que há uma interação entre o genótipo para APOE  $\epsilon$ 4 e para o NLRP3, sugerindo que possa haver um efeito sinérgico desses dois genes para o aumento no risco da doença de Alzheimer (TAN *et al.*, 2013). Em um estudo conduzido com pacientes chineses que sofreram acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico observou-se que ser heterozigoto para o polimorfismo rs10754558 (C/G) aumenta as chances de ter AVC isquêmico [RC: 1,52 (IC 95%: 1,19 – 1,97)], enquanto que se o indivíduo for homozigoto GG essas chances são ainda maiores [RC: 2,65 (IC 95%: 2,18 – 3,67)]. Neste mesmo estudo os autores avaliaram a influência deste polimorfismo na expressão do gene do NLRP3 através da análise de expressão do NLRP3 nas células mononucleares de sangue periférico dos indivíduos homozigotos (C/C ou G/G) e heterozigotos (C/G) com AVC isquêmico e verificaram que apenas a presença do alelo G (seja na condição C/G ou G/G) aumenta significativamente a expressão do NLRP3 quando comparado aos indivíduos com AVC

isquêmico, mas portadores dos alelos C/C (ZHU *et al.*, 2016). De fato, especula-se que o alelo G pode desfazer o sítio primário de ligação, influenciando no recrutamento e ligação do microRNA-223 o qual foi demonstrado suprimir a expressão do NLRP3 através de um sítio de ligação conservado dentro da região 3'UTR, por fim levando a redução da transcrição do gene NLRP3 (ZHU *et al.*, 2016; BAUERNFEIND *et al.*, 2012).

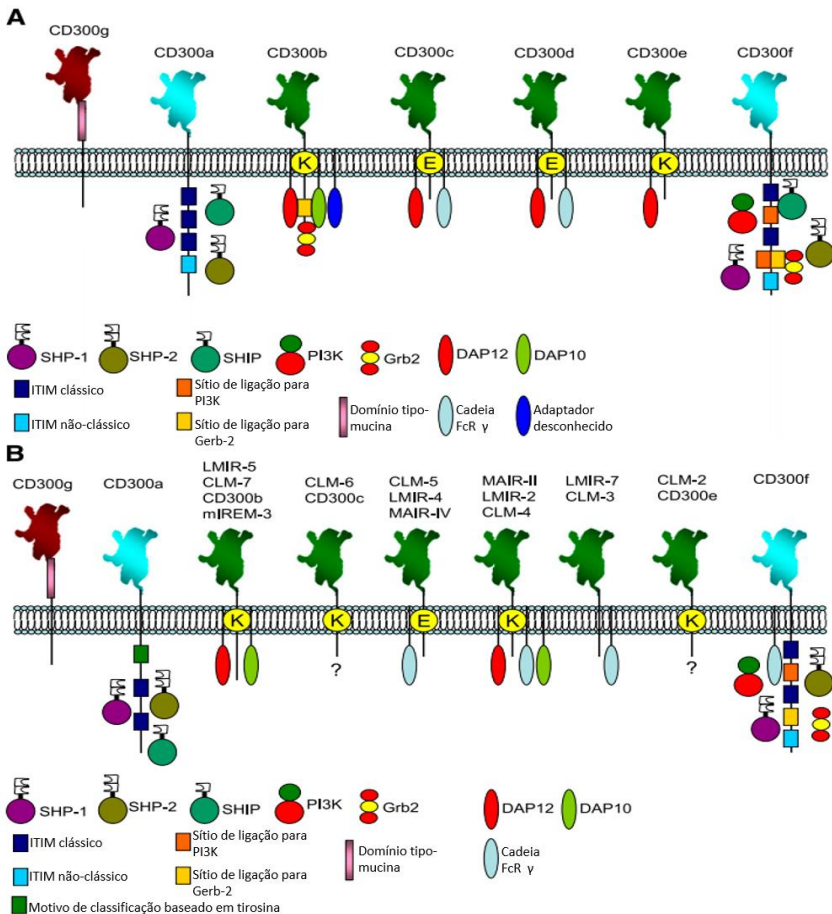
Os resultados mostrados apontam para o envolvimento do inflamassoma NLRP3 na fisiopatologia de diversas doenças. Com relação aos transtornos de humor, como o TDM, apesar das evidências pré-clínicas em diferentes modelos, os estudos clínicos ainda são bastante escassos na literatura e muitas questões permanecem não esclarecidas.

### **1.5. O papel do imunorreceptor CD300f na resposta imunológica**

Os imunorreceptores CD300 compõem uma família multigênica com 7 membros de receptores de membrana regulatórios localizados no cromossomo 17 em humanos e com 9 genes localizados no cromossomo 11 em roedores. Esses receptores atuam na regulação, direcionamento ou término de respostas imunes ativas (CLARK *et al.*, 2001), principalmente coordenando funções nas células mielóides (MARTINEZ-BARRIOCANAL *et al.*, 2010), mas também já foram identificados em neurônios e microglia (PELUFFO *et al.*, 2012). Os imunorreceptores CD300 são glicoproteínas transmembranares com um domínio único tipo IgV extracelular e uma membrana extensa na região proximal que é rica em aminoácidos como prolinas, serinas e treoninas, os quais ligam a porção Ig ao domínio transmembrana (VITALLÉ *et al.*, 2018; CLARK *et al.*, 2009). Dentre os receptores da família CD300 há um gene para o imunorreceptor CD300f em humanos e seu ortólogo CLM-1 está presente em roedores. Sabe-se que o equivalente humano está altamente expresso no pulmão e no baço e em células como monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, além de estar presente, porém menos expresso em outras células. Já o imunorreceptor CD300f em roedores está altamente expresso no baço, nas células como os granulócitos e mastócitos e nas células dendríticas da medula óssea. Enquanto que no SNC, tanto em humanos quanto em roedores, o imunorreceptor CD300f está majoritariamente expresso na microglia (VITALLÉ *et al.*, 2018; CLARK *et al.*, 2009).

Embora haja uma grande semelhança na estrutura dos receptores desta família, o imunorreceptor CD300f contém na sua cauda citoplasmática sequências de inibição de imunorreceptor baseada em tirosina (ITIM, do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), além de outros motivos de tirosinas. O domínio citoplasmático dos imunorreceptores CD300f contém motivos de internalização e a expressão dessa molécula na superfície das células deve ser em parte regulada pela internalização. De fato, a internalização indica que este receptor está envolvido em processos como fagocitose, exposição de antígenos, regulação de mecanismos efetores e até mesmo infecção viral (CHOI *et al.*, 2011). O imunorreceptor CD300f humano possui 5 motivos baseados em tirosinas (Y205, Y236, Y249, Y284 e Y263) na sua cauda citoplasmática, sendo 2 motivos com a sequência clássica ITIM (I/V/LxYxxL/V) e um terceiro com a sequência ITIM não clássica ou permissiva (I/V/L/S/TxYxxL/V/I) (Figura 6). Os outros 2 motivos possuem sequências YxxM que iniciam nas tirosinas Y236 e Y263 e levam à interação do receptor com a subunidade regulatória p85 $\alpha$  da proteína fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), com um desses motivos sendo capaz de se ligar adicionalmente ao fator de transcrição Grb2 (do inglês, *Growth factor receptor-bound protein 2*). Já o imunorreceptor CD300f de roedores possui dois motivos ITIM clássicos e um não clássico, um motivo de ligação para PI3K e um motivo de ligação para Grb2 (VITALLÉ *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2014; BORREGO, 2013; ÁLVAREZ-ERRICO, SAYÓS e LÓPEZ-BOTET, 2007).

**Figura 6: Representação esquemática dos imunorreceptores CD300 em humanos e em roedores**



**Legenda:** Os imunorreceptores CD300 estão representados em humanos (A) e em roedores (B). O domínio extracelular dos receptores que contém um motivo ITIM estão representados em azul turquesa, enquanto os não-ITIM estão representados em verde. Os motivos de sinalização de cada receptor estão indicados e as interações que cada um faz com moléculas como as fosfatases, moléculas adaptadoras e as cinases estão representadas na cauda citoplasmática de cada receptor. Os pontos de interrogação indicam que a sinalização ainda não foi determinada. Em particular, o imunorreceptor inibitório CD300f em humanos possui dois motivos ITIM-clássicos, um não-clássico e um sítio de ligação para PI3K e um para Grb2 na sua cauda citoplasmática e faz interações com as fosfatases SHP-1, SHP-2 e SHIP, com a proteína cinase PI3K e com a

proteína Grb2. Já o imunorreceptor CD300f em roedores possui os mesmos motivos na sua cauda citoplasmática e pode fazer interações com as fosfatases SHP-1 e SHP-2, com a proteína Grb2 e com uma cadeia FcR  $\gamma$ . *ITIM: Sequências de inibição de imunorreceptor baseada em tirosina; PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase; Grb2: Proteína 2 ligada à receptores para fatores de crescimento* (Adaptado de BORREGO *et al.*, 2013).

Os motivos de ITIM quando fosforilados são capazes de recrutar diferentes fosfatases dependendo do tipo celular. Tanto o imunorreceptor CD300f em humanos quanto em roedores parecem estar associados com as proteínas tirosina fosfatase SHP-1 e SHP-2, as quais são essenciais para o efeito inibitório do CD300f (KIM *et al.*, 2011). Em um estudo com células de uma linhagem mielomonocítica (U937), verificou-se através de imunoprecipitação que a fosfatase SHP-1 pode ser recrutada pelo CD300f (ÁLVAREZ-ERRICO, SAYÓS e LÓPEZ-BOTET, 2007). Utilizando-se de células THP-1 observou-se que tanto a fosfatase SHP-1 quanto SHP-2 são fosforiladas pelo imunorreceptor CD300f e inibem o aumento da interleucina-8 induzida pelo tratamento das células com LPS (KIM *et al.*, 2011).

Utilizando o tratamento de células THP-1 com anticorpos monoclonais e peptídeos sintéticos representativos dos motivos ITIM do imunorreceptor CD300f, observou-se o bloqueio na expressão da interleucina-8 e da metaloproteinase-9 mediada pelos receptores TLR-2, 3, 4 e 9. Além disso, se observou que houve a inibição da molécula MyD88, supressão da ativação da cinase I $\kappa$ B e consequentemente inibição da fosforilação e degradação de I $\kappa$ B e supressão do fator de transcrição NF $\kappa$ B (LEE *et al.*, 2011). Além disso, esses peptídeos sintéticos foram capazes de inibir TNF- $\alpha$  e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *Monocytic chemoattractant preotein-1*) além da via TRIF (*Toll-interlekin 1 receptor (TIR)-domain containing adapter-inducing interferon  $\beta$* ) mediada pelos receptores TLR através do recrutamento de SHP-1 e PI3K ao imunorreceptor CD300f, indicando que esses peptídeos sintéticos podem ser utilizados para regular respostas imunes que envolvem ativação inflamatória mediada pelos TLRs em macrófagos (LEE, SUK e LEE, 2012).

Foi demonstrado que a ceramida extracelular parece ser um ligante natural dos imunorreceptores CD300f e induz a fosforilação do receptor e o recrutamento de SHP-1 e SHP-2 (IZAWA *et al.*, 2012). Em mastócitos a ceramida é capaz de ligar-se ao CD300f regulando de forma inibitória o receptor de alta afinidade Fc $\epsilon$ RI que medeia a ativação dos mastócitos (IZAWA *et al.*, 2012). Animais com depleção

genética para o imunorreceptor CD300f apresentam alta propensão para desenvolver colite, porém, o tratamento com a ceramida diminuiu o quadro de colite em animais selvagens e inibiu a sinalização do receptor P2X7 via ATP exógeno em mastócitos, demonstrando que a ceramida atua na inibição da ativação de mastócitos através dos imunorreceptores CD300f (MATSUKAWA *et al.*, 2015). A ceramida, atuando nos imunorreceptores CD300f, foi capaz de inibir a inflamação de pele induzida por LPS, implicando este receptor como um regulador negativo da sinalização de TLR-4 *in vivo* (SHIBA *et al.*, 2017). Foi demonstrado que o imunorreceptor CD300f tem como ligante outros fosfolipídios. Um exemplo é a ligação de fosfatidilserina que resulta na ativação do imunorreceptor CD300f e aumenta a fagocitose das células apoptóticas pelos mastócitos (IZAWA *et al.*, 2014).

Uma característica do CD300f é que ele também exibe um potencial de ativação que é mais evidente quando o imunorreceptor CD300f está em ligação cruzada em células que expressam receptores com motivos ITIM mutados (BORREGO, 2013). Além disso, um estudo avaliou as interações entre os membros da família dos receptores CD300 e demonstrou que os imunorreceptores CD300f são capazes de formar heterodímeros em células COS-7 transfectadas com o imunorreceptor CD300c e o CD300b, contudo, apenas a atividade do CD300b foi engrandecida com a presença do CD300f (MARTÍNEZ-BARRIOCANAL *et al.*, 2010). Ainda, quando o imunorreceptor CD300f está co-localizado com o receptor IL-4R $\alpha$  ocorre uma potencialização da resposta imune pelo aumento da sinalização, liberação e ativação de IL-4 e IL-13 (MOSHKOVITS *et al.*, 2015). Nesse contexto, a sinalização envolvida e os ligantes que agem nesses heterocomplexos ainda precisam ser melhor elucidados, trazendo a possibilidade da existência de muitas outras ações que talvez possam ser executadas ou iniciadas pelos receptores da família das moléculas CD300.

Poucos estudos até o momento foram realizados no intuito de evidenciar o papel neuroprotetor dos imunorreceptores CD300f. PELUFFO e colaboradores (2012) mostraram que o aumento da expressão do CD300f em modelo animal de dano excitotóxico induzido pela administração estriatal de N-metil D-aspartato (NMDA) diminuiu significativamente a área da lesão (PELUFFO *et al.*, 2012). Além disso, ocorre um aumento da expressão do RNAm e dos níveis proteicos dos imunorreceptores CD300f após a lesão de nervo ciático em modelo animal, o que provavelmente deve estar envolvido na regulação da neuroinflamação, no recrutamento e polarização de macrófagos e na



regeneração do nervo (PELUFFO *et al.*, 2015). Um estudo recente utilizando uma co-cultura de astrócitos transfectados com CD300f e neurônios hipocâmpais demonstrou que o aumento da expressão induzida de CD300f nos astrócitos diminuiu a perda neuronal induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide, efeito que deve ocorrer devido a interação célula-célula entre neurônios-astrócitos (LIMA *et al.*, 2017).

Um estudo de genoma *wide scan* (GWAS) que avaliou 17.686 mulheres saudáveis identificou no *loci* 17q25.1 do genoma um polimorfismo rs10512597 pertencente ao CD300f com uma importante associação com os níveis aumentados de proteína C reativa e fibrinogênio na trombose, agregação plaquetária e inflamação (DANIK *et al.*, 2009). Interessantemente, esta localização 17q do genoma já havia sido associada com outra doença de base inflamatória como a psoríase (NAIR *et al.*, 1997). Por outro lado, em um estudo de casos e controles de esclerose múltipla, o alelo T do polimorfismo rs2034310 (C/T) foi identificado como um alelo de risco para a esclerose múltipla. O primeiro estágio deste estudo encontrou a associação da doença com o alelo T deste polimorfismo e incluiu 975 casos com esclerose múltipla e 1.466 controles no Reino Unido. Outra associação foi verificada em um segundo estágio do estudo com indivíduos do Reino Unido e dos Estados Unidos considerando 1.038 casos e 1.379 controles. Uma terceira fase do estudo incluiu 2.406 casos e 1.216 controles, com indivíduos pertencentes à Austrália, Itália e Reino Unido, contudo nenhuma associação foi significativa. Por fim, a análise combinada de dados incluindo os resultados encontrados em todas as fases do estudo apontam para uma associação significativa entre o alelo T do polimorfismo rs2034310 e a esclerose múltipla (BAN *et al.*, 2010). Não se sabe ainda qual o impacto do polimorfismo rs2034310 na funcionalidade do imunorreceptor CD300f. Contudo, um estudo recente identificou que o polimorfismo (rs1411171369) no gene do imunorreceptor CD300f é responsável por uma troca dos aminoácidos arginina por glutamina na posição 33 (R33Q). Essa alteração parece levar a uma diminuição da expressão do CD300f na superfície dos monócitos periféricos de pacientes com esclerose múltipla quando comparados aos indivíduos controles. A mutação não demonstrou afetar a capacidade dos receptores CD300f de formarem complexos, porém, a forma do receptor R33Q mutada pode afetar a estabilidade da proteína (MARTÍNEZ-BARRIOCANAL *et al.*, 2017). De fato, alterações na funcionalidade do imunorreceptor CD300f podem explicar uma diminuição da sinalização anti-inflamatória.

Apesar das evidências demonstrando um potencial neuroprotetor e anti-inflamatório dos imunorreceptores CD300f, não existem estudos demonstrando seu envolvimento nos transtornos de humor, que também possuem um perfil inflamatório. Além disso, o efeito de um polimorfismo de troca única, como o rs2034310 (C/T) ainda não foi avaliado em doenças psiquiátricas como o TDM.

## 2. JUSTIFICATIVA

Segundo os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), referentes à 2015, o TDM afeta 322 milhões de pessoas no mundo, sendo duas vezes mais prevalente em mulheres do que em homens. Em um período de 10 anos (de 2005 a 2015) o número de indivíduos afetados cresceu 18,4%, atingindo 4,4% da população mundial. No Brasil, estima-se que 5,8% da população apresente o TDM, o que corresponde a um total de 11,5 milhões de brasileiros. Segundo os dados da OMS, o Brasil é o país com maior prevalência de TDM da América Latina e o segundo com maior prevalência nas Américas, ficando atrás dos Estados Unidos, que têm 5,9%. Atualmente, o TDM é a principal causa de incapacidade em todo o mundo, levando a um grande impacto social e à uma baixa qualidade de vida para o sujeito e sua família, gerando um importante impacto econômico no sistema público de saúde (KUPFERBERG *et al.*, 2016; de VOS *et al.*, 2015; FOSTICK *et al.*, 2010). Além disso, em 2015 o suicídio representou quase 1,5% de todas as mortes no mundo, figurando entre as 20 maiores causas de morte. Entre jovens de 15 a 29 anos, o suicídio foi a segunda maior causa de morte em 2015 (WHO, 2015).

Apesar do impacto na população, as dificuldades na compreensão da neurobiologia do TDM passam pela falta de validade dos sistemas de classificação diagnóstica atual que, apesar de apresentarem uma boa confiabilidade do ponto de vista clínico, carecem de validade biológica. Pacientes que se enquadram na mesma categoria diagnóstica podem apresentar formas muito heterogêneas da doença e não compartilhar necessariamente dos mesmos mecanismos fisiopatológicos. Até o momento, não existem marcadores biológicos preditivos ou com valor diagnóstico para auxiliar na identificação do TDM (INSEL *et al.*, 2010). Além disso, o tratamento farmacológico atual para o TDM não é eficaz para 30 - 50% dos pacientes, apresenta muitos efeitos colaterais e início tardio de ação, o que se torna particularmente preocupante em pacientes graves e com risco de suicídio (GURURAJAN *et al.*, 2016). Essa discrepância provavelmente ocorre porque o TDM é um transtorno heterogêneo e multifatorial, envolvendo muitos tipos celulares e alterações nos diferentes sistemas fisiológicos, onde cada sujeito parece apresentar uma combinação de mecanismos patológicos únicos (DEAN e KESHAVAN, 2017). Além disso, estudos recentes demonstram diferenças significativas na patofisiologia do TDM em homens em mulheres, com relação à manifestação dos sintomas, severidade e até

mesmo no padrão de expressão gênica (SENEY *et al.*, 2018), um tópico extremamente relevante e ainda pouco explorado.

A presença de inflamação é uma característica comum associada a processos degenerativos encontrados em várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos. Embora esta associação seja evidente na literatura tanto em pacientes quanto em modelos animais, sua relação causal e sua contribuição relativa para a etiologia e progressão do TDM permanece pouco elucidada. Apesar de parecer um alvo promissor, a literatura demonstra que o uso de fármacos anti-inflamatórios no tratamento ou como adjuvante na terapia antidepressiva não tem demonstrado resultados satisfatórios. Contudo, a compreensão de diferentes aspectos neurobiológicos que associem o estresse (principal fator ambiental na etiologia do TDM), a inflamação periférica (frequentemente observada em pacientes com TDM) e a neuroinflamação (possível responsável por alterações comportamentais), podem oferecer novos caminhos para uma melhor caracterização do quadro do TDM, para um diagnóstico mais preciso e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Neste sentido, esta tese está focada em estabelecer o impacto do complexo do inflamassoma NLRP3 e do imunorreceptor CD300f em alterações neuroquímicas e comportamentais relevantes para o TDM e insere-se no esforço que vem sendo realizado para investigar os aspectos inflamatórios envolvidos na fisiopatologia do TDM e na manifestação de diferentes sintomas dentro do diagnóstico de depressão. Assim, somaremos forças para um melhor entendimento das bases biológicas do TDM e uma melhor compreensão de possíveis diferenças neurobiológicas de acordo com o sexo, o que pode gerar o desenvolvimento de novos modelos animais e até mesmo a otimização de estratégias terapêuticas de acordo com as características clínicas de cada paciente.

### **3. HIPÓTESES**

#### **3.1. Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no transtorno depressivo maior**

1. O tratamento com um fármaco que inibe o inflamassoma NLRP3 é capaz de prevenir as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo estresse crônico em camundongos fêmeas.

2. O genótipo GG do polimorfismo rs10754558 (C/G) no gene do inflamassoma NLRP3, por estar associado a um ganho de função, está associado a maiores níveis séricos de IL-1 $\beta$  e também à maior prevalência do TDM em um estudo transversal em humanos.

#### **3.2. Envolvimento dos imunorreceptores CD300f no transtorno depressivo maior**

1. Camundongos com depleção genética do imunorreceptor CD300f, majoritariamente anti-inflamatório, apresentam alterações comportamentais associadas à depressão e anedonia, além de alterações neuroquímicas como um perfil inflamatório cerebral e alterações nos níveis das monoaminas.

2. O polimorfismo rs2034310 (C/T) no gene do imunorreceptor CD300f está associado ao TDM e a maiores níveis séricos de IL-1 $\beta$  em um estudo transversal em humanos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar se o complexo do inflamassoma NLRP3 e o imunorreceptor CD300f estão associados ao TDM utilizando modelos animais de depressão e estudos em humanos.

### **4.2. Objetivos específicos**

#### **4.2.1. Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no transtorno depressivo maior**

1. Avaliar se o tratamento com glibenclamida previne as alterações comportamentais induzidas pelo ECI, com foco no comportamento depressivo, ansiedade e função cognitiva em camundongos fêmeas;

2. Avaliar se o tratamento com glibenclamida e o ECI induz a ativação da via de sinalização mediada pelo complexo inflamassoma NLRP3 no hipocampo e córtex pré-frontal;

3. Avaliar se o tratamento com glibenclamida e o ECI induz alterações nos níveis dos neurotransmissores monoaminérgicos como serotonina, dopamina e noradrenalina no hipocampo e córtex pré-frontal;

4. Avaliar a relação entre os diferentes genótipos do polimorfismo rs10754558 (C/G) no gene do inflamassoma NLRP3 e os níveis séricos da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  em indivíduos controle e em indivíduos diagnosticados com TDM.

#### **4.2.2. Envolvimento do imunorreceptor CD300f no transtorno depressivo maior**

1. Avaliar as alterações comportamentais presentes nos camundongos machos e fêmeas com depleção genética dos imunorreceptores CD300f (CD300f $^{-/-}$ ), com foco no comportamento depressivo, motivacional/anedônico, de ansiedade e compulsão;

2. Avaliar se as alterações comportamentais observadas nos camundongos CD300f<sup>-/-</sup> persistem com a idade;

3. Avaliar o efeito da depleção dos imunorreceptores CD300f sobre os níveis hipocâmpais de neurotransmissores monoaminérgicos como serotonina, dopamina e noradrenalina;

4. Avaliar se o tratamento com o antidepressivo bupropiona pode reverter as alterações comportamentais observadas nos animais CD300f<sup>-/-</sup>;

5. Avaliar o efeito da depleção dos imunorreceptores CD300f na expressão de genes envolvidos na inflamação e na via do inflamassoma NLRP3 no homogenato de cérebro total.

6. Avaliar o efeito da depleção dos imunorreceptores CD300f sobre os níveis proteicos da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no hipocampo;

7. Avaliar o efeito da administração aguda de LPS sobre o comportamento anedônico em animais CD300f<sup>-/-</sup> e selvagens;

8. Avaliar a relação entre os diferentes genótipos do polimorfismo rs2034310 (C/T) no gene do imunoreceptor CD300f e os níveis séricos de IL-1 $\beta$  em indivíduos controles e diagnosticados com TDM.

## 5. RESULTADOS

### CAPÍTULO I: ENVOLVIMENTO DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

#### 1. Estudo em roedores: O tratamento com glibenclamida previne o comportamento depressivo induzido pelo estresse crônico e induz alterações neuroquímicas e inflamatórias

O TDM é um transtorno psiquiátrico comum, recorrente e incapacitante que afeta muitas pessoas ao redor do mundo (NEMEROFF, 2007). Esse transtorno é caracterizado por manifestações afetivas, especialmente no humor e perda de interesse e prazer nas atividades diárias (KRISHNAN e NESTLER, 2008). O TDM deverá afetar uma grande parte da população até 2020, sendo considerado uma grande preocupação epidemiológica por contribuir para o aumento no número de anos vividos com incapacidade e causar um considerável impacto econômico e social (VOS *et al.*, 2015; MURRAY *et al.*, 1996). Além disso, o TDM é um fator de risco independente para muitas condições clínicas, incluindo doenças cardiovasculares, metabólicas e neurodegenerativas (DUMAN *et al.*, 2016; PAPAKOSTAS *et al.*, 2004). A etiologia do TDM ainda não é completamente compreendida e parece ter origem multifatorial, envolvendo disfunção em múltiplas áreas encefálicas (córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens), diferentes tipos de células (neurônios, astrócitos e microglia) e alterações em diversas outras funções incluindo a expressão gênica, metabolismo e bioenergética, bem como a resposta imune (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

O TDM é frequentemente associado a condições inflamatórias e autoimunes crônicas (CHEN *et al.*, 2017). Ainda não está claro se os processos inflamatórios constantes são uma causa ou consequência do TDM, ou mesmo se estes estão presentes em todos os indivíduos diagnosticados, mas muitos pacientes apresentam níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, que são normalizadas após o tratamento antidepressivo (WIĘDŁOCHA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2017). O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico formado por um PRR chamado NLR, uma proteína adaptadora ASC e uma pró-caspase-1 que é clivada em sua forma ativa quando a multipartícula do inflamassoma NLRP3 se forma (IWATA *et al.*, 2013). Após a montagem, o NLRP3 contendo a enzima caspase-1, ativada através de uma clivagem proteolítica da pró-caspase-1, é



responsável pela ativação das pró-formas de IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas maduras que podem ser liberadas pela célula para atuarem como mediadores inflamatórios (DE RIVERO VACCARI, DIETRICH e KEANE, 2014).

A ativação do complexo inflamassoma NLRP3 e os níveis elevados de IL-1 $\beta$  e IL-18 têm sido associados ao TDM tanto em estudos clínicos, quanto em modelos pré-clínicos de estresse crônico, estresse de contenção, comportamento depressivo induzido por LPS e estresse pré-natal em roedores (KAUFMANN *et al.*, 2017; OGŁODEK, 2017). Além disso, antidepressivos de diferentes classes parecem diminuir a expressão do inflamassoma NLRP3 e a produção de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com TDM (ALCOCER-GOMÉZ *et al.*, 2017; ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2014).

A glibenclamida (também chamada de gliburida), é um medicamento hipoglicemiante usado no tratamento da diabetes mellitus e atua por meio da inibição dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), conhecidos como Sur1-Kir6.2 (ASHCROFT, 2006). LAMKANFI e colaboradores (2009) demonstraram que a glibenclamida é capaz de inibir o inflamassoma NLRP3 e a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos periféricos (LAMKANFI *et al.*, 2009). No SNC, os canais regulados por Sur1 incluindo o  $K_{ATP}$  Sur-Kir6.2 e o canal não seletivo sensível ao cálcio Sur1-Trpm4 são expressos em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais e microglia (SIMARD *et al.*, 2012). O tratamento com glibenclamida inibe ambos os canais e melhora significativamente a neuroinflamação (ZHANG *et al.*, 2017). De fato, a inibição dos canais Sur1-Trpm4 está associada à proteção contra lesões e inflamação no SNC (ZHANG *et al.*, 2017). Em um estudo *post-mortem*, pacientes com hemorragia subaracnóide tiveram um aumento na expressão cortical dos canais Sur1-Trpm4 (TOSUN *et al.*, 2013). Além disso, em um modelo animal de hemorragia subaracnóide no córtex entorrinal, o aumento da expressão dos canais Sur1-Trpm4 associado à neuroinflamação e ao comprometimento da memória foi revertido pela administração sistêmica de glibenclamida durante sete dias. O tratamento com glibenclamida também reduziu o dano e a morte dos neurônios hipocámpais, juntamente com a super-expressão de TNF- $\alpha$ , e os déficits na aprendizagem e na memória espacial observados no labirinto aquático de Morris (TOSUN *et al.*, 2013).

O mecanismo de inibição do inflamassoma NLRP3 pela glibenclamida não é completamente compreendido. Foi observado que

por bloquear os canais de  $K_{ATP}$  e prevenir o efluxo de  $K^+$ , a glibenclamida é capaz de induzir alterações no potencial da membrana, evitando a entrada de cálcio pelos receptores de ATP do subtipo P2X7, o que leva a uma diminuição da inflamação (ZHANG *et al.*, 2017). Por outro lado, a glibenclamida também pode exercer efeitos neuroprotetores atuando por outros mecanismos. Já foi demonstrado que a inibição dos canais Sur1-Trpm4 pela glibenclamida leva à normalização dos níveis e da localização celular da proteína zona occludens 1, o que diminuiu a permeabilidade da BHE induzida pelo modelo murino de hemorragia subaracnóide. Este efeito reduziu o extravasamento de proteínas e a entrada de células imunes no parênquima encefálico, reduzindo a propagação de processos inflamatórios (ZHANG *et al.*, 2017; SIMARD *et al.*, 2009).

Já foi demonstrado que a administração intracerebroventricular de glibenclamida reduz o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao TNF, um indicativo de efeito antidepressivo (KASTER *et al.*, 2007). No entanto, os benefícios potenciais da glibenclamida como uma estratégia farmacológica para combater processos inflamatórios crônicos e de baixo grau associados aos TH precisam ser melhor elucidados. Recentemente observou-se o efeito do tratamento com glibenclamida em camundongos C57BL/6J machos submetidos à um modelo de estresse crônico moderado por 12 semanas, associado com resistência à insulina (SU *et al.*, 2017). O tratamento foi capaz de melhorar não apenas a resistência à insulina e a sinalização hipocampal mediada pela insulina, mas também prevenir a ativação do inflamassoma NLRP3 e o comportamento anedônico e depressivo induzidos pelo estresse (SU *et al.*, 2017). Porém, o impacto da glibenclamida em outros comportamentos e vias neuroquímicas relacionadas ao estresse e ao TDM não são conhecidos. Nesse contexto, o presente capítulo tem a hipótese de que, através da inibição e normalização dos processos inflamatórios relacionados ao inflamassoma NLRP3 e da neurotransmissão monoaminérgica, a administração sistêmica de glibenclamida pode prevenir alterações comportamentais em um modelo de depressão induzido pelo ECI de 21 dias em camundongos fêmeas.

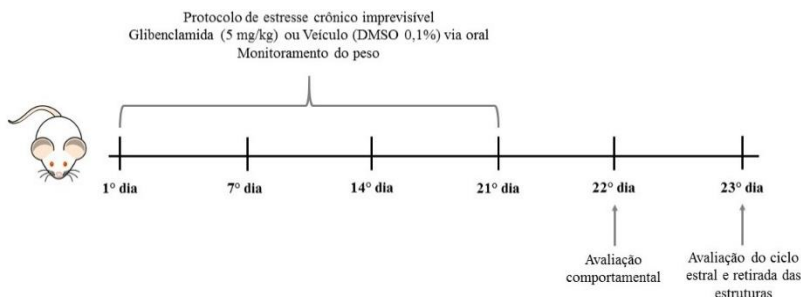
## **1. Métodos**

### **1.1. Animais, tratamento e delineamento do estudo**

Camundongos Swiss fêmeas (45-50 dias de idade, 30-35 g) foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina

(UFSC), SC - Brasil. Os animais foram mantidos em ambiente controlado ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12 h-ciclo claro/escuro, livre acesso à comida e água, com exceção de alguns dias específicos do protocolo de ECI) e foram manipulados de acordo com as normas da Federação de Sociedades de Biologia Experimental sob aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA UFSC protocolo número: 5021180116). Os camundongos foram tratados com glibenclamida (5 mg/kg, v.o., #G2539; Sigma, St. Louis, MO) ou veículo (dimetilsulfóxido 0,1%, DMSO, v.o.) obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA) e os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: *Controle + Veic* (Não-estressado + DMSO 0,1% v.o.); *Controle + Glib 5* (Não-estressado + Glibenclamida 5 mg/kg v.o.); *ECI + Veic* (Protocolo ECI + DMSO 0,1% v.o.); *ECI + Glib 5* (Protocolo ECI + Glibenclamida 5 mg/kg v.o.). O tratamento foi realizado durante 21 dias, começando no primeiro dia do protocolo de ECI e o peso dos animais foi monitorado semanalmente (Figura 1).

**Figura 1: Delineamento do estudo**



**Legenda:** O protocolo de ECI foi realizado entre o 1º e 21º dia e os animais foram tratados com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) ou veículo (DMSO 0,1%, v.o.) uma vez ao dia durante todo o protocolo de ECI. O ganho de peso foi monitorado semanalmente durante a manipulação dos animais. Vinte e quatro horas após o último tratamento (no 22º dia), os animais foram removidos do último estressor (caixa inclinada por 24 h) e submetidos à análise comportamental após 1 h. No 23º dia o ciclo estral foi avaliado e os animais foram eutanasiados para a coleta das estruturas encefálicas: hipocampo e córtex pré-frontal. Todas as amostras removidas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até as análises neuroquímicas e inflamatórias. *ECI: Estresse crônico imprevisível.*

## 1.2. Protocolo experimental de ECI de 21 dias

Este protocolo foi desenhado para induzir o comportamento depressivo em camundongos, como previamente proposto (KASTER *et al.* 2015). Esse paradigma maximiza a imprevisibilidade e consiste em uma variedade de estressores aplicados randomicamente durante 21 dias para prevenir a adaptação (Tabela 1). O último estressor, caixa inclinada 45° por 24 horas, começou no 21° dia as 9 horas da manhã e terminou no 22° dia as 9 horas. Os testes comportamentais começaram 1 hora após os animais serem retirados do último estressor (10 horas da manhã do 22° dia). Os animais controles foram mantidos nas caixas de residência e não foram manipulados.

**Tabela 1. 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°)

## 1.3. Análises comportamentais

O último estressor foi executado na sala onde os animais realizaram os testes comportamentais sob as mesmas condições do biotério (23 ± 2°C, 12 h-ciclo claro/escuro, livre acesso à comida e água) para que eles habituassem ao novo ambiente. Após o último estressor [Caixa inclinada (45°) durante 24h] os animais foram submetidos a diversos testes comportamentais. Todos os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro em uma sala livre de ruídos e sob pouca luminosidade, a qual foi condicionada por uma lâmpada de luz vermelha acionada 1h antes dos testes para habituação dos animais. Um grupo de animais foi submetido ao teste do campo

aberto seguido pelo teste de suspensão pela cauda. Um segundo grupo de animais foi submetido ao teste do campo aberto seguido pelo teste do nado forçado e um terceiro grupo foi submetido ao teste do labirinto em cruz elevado seguido pelo teste de realocação de objetos. Todos os testes foram replicados pelo menos duas vezes em grupos de animais diferentes.

### **1.3.1. Teste do campo aberto**

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar a atividade locomotora e excluir possíveis alterações no tempo de imobilidade dos animais no TSC e no TNF que poderiam refletir em mudanças na atividade locomotora (NEIS *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 1996). O aparato consistiu em uma caixa branca de madeira medindo (40 cm x 60 cm x 50 cm altura) com o piso dividido em 12 quadrantes iguais. Os animais foram expostos a arena durante 6 minutos e o número total de quadrantes cruzados com as 4 patas foi contado e considerado como atividade locomotora. A arena foi limpa com álcool 10% entre os animais para excluir possíveis pistas olfativas.

### **1.3.2. Teste de suspensão pela cauda**

O teste de suspensão pela cauda é um modelo de desespero comportamental proposto por STERU e colaboradores (1985) e desenvolvido com base no teste do nado forçado. Neste teste, os camundongos foram submetidos a uma situação estressante e inescapável, onde foram suspensos pela cauda. A falta de tentativas de escapar da situação aversiva é considerada imobilidade (STERU *et al.*, 1985). Para realizar o TSC, os camundongos foram suspensos pela cauda acima do solo por uma fita adesiva presa em sua cauda aproximadamente 1 cm da ponta e o tempo de imobilidade foi registrado e avaliado durante 6 minutos (NEIS *et al.*, 2015). Neste teste é esperado que o ECI aumente e que o tratamento com antidepressivos diminua o tempo de imobilidade dos animais.

### **1.3.3. Teste do nado forçado**

O teste do nado forçado é um modelo de desespero comportamental geralmente utilizado na avaliação dos efeitos antidepressivos ou depressogênicos de compostos ou manipulações (CRYAN *et al.*, 2002). Neste teste, cada camundongo foi individualmente forçado a nadar em um recipiente cilíndrico aberto (10 cm de diâmetro x 25 cm de altura) contendo aproximadamente 19 cm de profundidade de água à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e o tempo de imobilidade foi

registrado durante 6 minutos (PORSOLT, BERTIN & JALFRE, 1977). A mobilidade foi definida quando os animais executavam movimentos vigorosos para sair da situação estressante aguda. Não foi considerado mobilidade os pequenos movimentos executados pelos animais apenas para manter o equilíbrio ou manter a cabeça acima da água (CAN *et al.*, 2012). Neste teste é esperado que o ECI aumente e que o tratamento com antidepressivos diminua o tempo de imobilidade dos animais.

#### **1.3.4. Teste do labirinto em cruz elevado**

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para avaliar os comportamentos relacionados à ansiedade (LISTER, 1987). O aparato consistiu em uma plataforma central quadrada (6 x 6 cm) e dois braços abertos (30 x 6 cm) alinhados perpendicularmente a dois braços fechados (30 x 6 x 16 cm) e elevados 50 cm acima do chão. Os braços abertos continham 1 cm de altura nas bordas para evitar que os camundongos caíssem. Os animais foram colocados individualmente na plataforma central entre o braço aberto e o braço fechado, e a sua atividade espontânea foi registrada durante 5 minutos. O aparato foi limpo usando etanol a 10% entre os animais para excluir possíveis pistas olfatórias. A % de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado foi calculada usando o tempo total nos braços abertos + o tempo total nos braços fechados como 100%. Um aumento do tempo gasto nos braços abertos foi considerado como uma medida de comportamento ansiolítico. O número de entradas nos braços fechados foi usado como outra medida de locomoção espontânea.

#### **1.3.5. Teste de realocação de objetos**

Este teste é usado para medir a capacidade cognitiva espacial. Os animais foram habituados em uma caixa de madeira branca (40 cm x 60 cm x 50 cm de altura), durante 5 minutos, e retornaram à sua caixa de residência. Após 24h, os animais passaram por uma sessão de treinamento, onde foram expostos durante 5 minutos a dois objetos idênticos localizados na caixa (objetos A e B medindo 6 cm de profundidade x 3 cm de largura x 7 cm de altura) separados por uma distância de 15 cm, 8,5 cm da parede traseira e 8,5 cm da parede lateral. O tempo de exploração de cada objeto na sessão de treinamento foi analisado para garantir que os camundongos não tivessem preferência pelo objeto A ou B. Após a sessão de treinamento, os camundongos foram então devolvidos à sua caixa de residência e um intervalo de 180 minutos foi realizado. Na sessão de teste, após os 180 minutos de intervalo, os animais foram reexpostos à caixa com o objeto B realocado

para outro local dentro da caixa, na direção oposta ao objeto A (YAMADA *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2016). O tempo de exploração dos objetos A e B foi registrado nesta sessão durante 5 minutos. O índice de aprendizagem foi calculado na sessão de teste da seguinte forma:  $(\text{tempo no objeto B} \times 100) / (\text{tempo no objeto B} + \text{tempo no objeto A})$ . O aparato foi limpo usando etanol a 10% após cada sessão para excluir possíveis pistas olfativas. Neste teste é esperado que os animais explorem por mais tempo o objeto realocado, a ausência desta resposta revela uma falha na memória.

#### **1.4. Avaliação do ciclo estral**

Vinte e quatro horas após o último teste comportamental (no 23º dia), avaliou-se o estágio do ciclo estral dos camundongos fêmeas. Os animais foram segurados pela cauda com as patas dianteiras apoiadas em uma superfície de gaiola. Uma pipeta Pasteur contendo solução salina a 0,9% foi introduzida na vagina das fêmeas, lavando-a suavemente de três a cinco vezes com a mesma solução salina. Uma solução final foi coletada e colocada em uma lâmina de vidro e o material foi observado sob microscópio de luz com objetiva de 10 × (BYERS *et al.*, 2012; CALIOGIONI, 2009). Três tipos celulares foram identificados: leucócitos, células epiteliais cornificadas e células epiteliais nucleadas. Cada lâmina de vidro foi caracterizada em um dos quatro estágios possíveis para o ciclo estral que incluem: proestro, estro, metaestro ou diestro.

#### **1.5. Obtenção das amostras, peso da adrenal e níveis de glicose no sangue**

Os animais foram eutanasiados por decapitação logo após a avaliação do ciclo estral (no 23º dia). As glândulas suprarrenais foram isoladas e pesadas. A fim de avaliar os níveis séricos de glicose, um grupo de camundongos (n=5, por grupo) foi deixado em jejum por 12 horas após a análise comportamental e antes da eutanásia. O sangue foi coletado do tronco logo após a decapitação e centrifugado (13.000 rpm, 10 min) para obter o soro. Os níveis de glicose no soro foram avaliados usando um kit específico para avaliação de glicose GOD-PAD obtido da Kovalente. As estruturas encefálicas como o hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecadas e todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C até as análises.

### 1.6. Western Blot

O hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados e homogeneizados mecanicamente em tampão de amostra (200 mM Tris, 40 mM EDTA, SDS 4%, pH 6,8) e imediatamente aquecidos por 5 minutos. Uma solução contendo 40% de glicerol, 50mM de Tris, azul de bromofenol e  $\beta$ -mercaptoetanol foi adicionado em cada amostra. As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry usando albumina bovina sérica (BSA) como padrão (LOWRY *et al.*, 1951) e então 60  $\mu$ g de proteína total de cada amostra foi pipetada por poço e separada por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 12% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foram bloqueadas por 1h com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O anticorpo primário para caspase-1 (Santa Cruz Biotechnology) foi diluído em TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, Tween-20 0,1%, pH 7,5), contendo 2,5% de albumina bovina sérica (BSA) e posteriormente foi incubado nas membranas contendo as proteínas em uma diluição de 1:1.000. As membranas foram lavadas com TBS-T, incubadas por 1h com anticorpo secundário anti-coelho ligado à peroxidase (Temecula CA92590, 1:5.000) e a imunorreatividade das bandas de procaspase-1 (p45) e caspase clivada (p10) foram reveladas por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante. 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 Image J software (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA). O imunoc conteúdo da caspase-1 foi corrigido através da determinação das proteínas totais das bandas reveladas pelo corante Ponceau S. e uma razão entre a DO das bandas da caspase-1/pró-caspase-1 foi determinada e apresentada.

### 1.7. Cromatografia Líquida de alta resolução (HPLC)

Os níveis hipocampais e no córtex pré-frontal de noradrenalina, dopamina e serotonina foram mensurados por HPLC. As amostras foram pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico (0,2 M) e centrifugadas (12.000 g) por 10 minutos. O sobrenadante foi injetado no sistema de HPLC (Jasco CO-2060 Plus – Intelligent Fluorescence Detector) equipado com uma coluna C18 (Microsorb-MV100-5 C18 chromatography column (250  $\times$  4.6 mm, 5 $\mu$ m). A temperatura da coluna foi mantida a 35°C e com uma taxa de corrente de 1,0 ml/min. A fase



móvel foi composta de tampão de acetato (12 mM CH<sub>3</sub>COOH, 0,26 mM Na<sub>2</sub>EDTA) e metanol (86:14, v/v) com pH 3,5 (DE BENEDETTO *et al.*, 2014). Os resultados foram expressos em ng/g de tecido.

### 1.8. ELISA

O hipocampo e o córtex pré-frontal 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%) e centrifugados (10.000g por 10 min a 4°C) e o sobrenadante foi coletado. Os níveis de IL-1β foram medidos no hipocampo e o córtex pré-frontal usando kits de imunoenensaio específicos (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Mouse IL-1β uncoated ELISA Kit). A placa foi selada com 100 µl 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, pH 7,4) e posteriormente foi bloqueada durante 1h utilizando 200 µl por poço do diluente ELISA/ELISPOT 1x. O padrão de IL-1β 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 µl 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 avidina-horseradish (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 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a placa foi lida em um espectrofotômetro à 450 nm. O coeficiente de variação intra-ensaio (C.V.) foi inferior a 5% e o ensaio inter-ensaio C.V. foi inferior a 10%. Os valores foram expressos em pg/mL.

### 1.9. Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados quanto a sua dispersão e normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas por ANOVA de duas vias seguida do teste de *post-hoc* de Bonferroni, quando apropriado. O peso dos animais foi analisado por ANOVA com medidas repetidas seguida do teste de *post-hoc* de Bonferroni e a diferença no tempo explorando o objeto A e

B no teste de realocação de objetos foi avaliada através do teste t de Student. Os níveis de IL-1 $\beta$  foram logaritimizados para realizar a análise paramétrica. Valores extremos foram identificados pelo teste de Grubbs e foram posteriormente excluídos das análises. Os dados estão representados como média $\pm$ E.P.M e  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **2. Resultados**

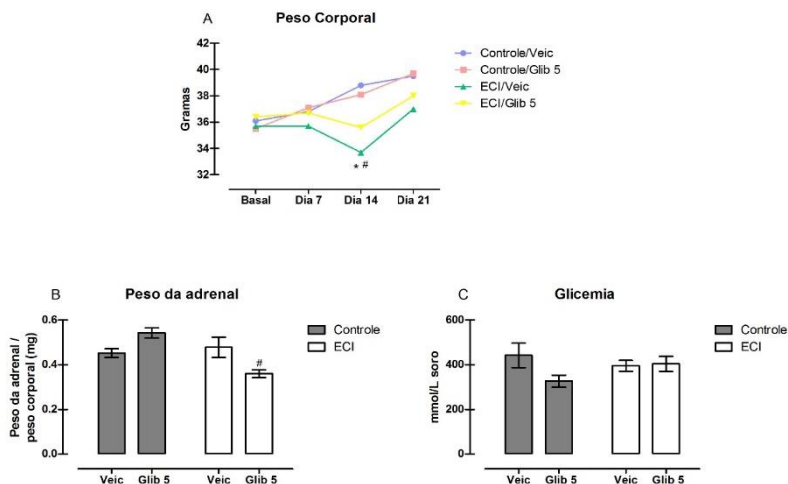
### **2.1. Alterações comportamentais induzidas pelo ECI e pelo tratamento com glibenclamida**

#### **2.1.1. Alterações de peso corporal, níveis séricos de glicose e peso da adrenal**

A Figura 2A mostra os efeitos do estresse e do tratamento com glibenclamida no peso corporal dos animais. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito significativo para o tempo [ $F(3,108)=27,96$ ,  $p < 0,001$ ] e para a interação entre tempo e ECI/tratamento [ $F(9,108)=6,00$ ,  $p < 0,0001$ ]. A análise de *post-hoc* de Bonferroni indicou que no 14<sup>o</sup> dia do protocolo de ECI, os animais estressados tiveram uma redução significativa no peso corporal quando comparados aos controles tratados com veículo ( $p < 0,01$ ) e aos controles tratados com glibenclamida ( $p < 0,05$ ) e este efeito não foi observado no 21<sup>o</sup> dia. Adicionalmente, em nenhum tempo observado encontrou-se diferenças significativas no peso dos animais estressados e tratados com glibenclamida quando comparados aos animais controles que receberam veículo. Estes resultados corroboram com dados prévios na literatura que demonstram a capacidade do ECI em influenciar o ganho de peso corporal e sugerem que este efeito possa ser minimizado pelo tratamento com glibenclamida. A Figura 2B mostra o peso da suprarrenal no final do protocolo de ECI, devidamente corrigido de acordo com o peso de cada animal. A ANOVA de duas vias apresenta um efeito significativo para o ECI [ $F(1,16)=7,40$ ,  $p=0,015$ ] e para a interação entre ECI e tratamento [ $F(1,16)=13,12$ ,  $p=0,002$ ], mas não para o tratamento com glibenclamida [ $F(1,16)=0,24$ ,  $p=0,632$ ]. A análise de *post-hoc* indicou que o grupo ECI + Glib 5 apresentou uma diminuição significativa no peso da adrenal ( $p=0,002$ ) quando comparado ao grupo Controle + Glib. Uma vez que a glibenclamida é um composto hipoglicêmico, os resultados exibidos na Figura 2C demonstram os efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida nos níveis séricos de glicose. Conforme revelado pela ANOVA de duas vias, não foram observadas diferenças

para o ECI [ $F(1,16)=0,17$ ,  $p=0,681$ ], para o tratamento [ $F(1,16)=2,12$ ,  $p=0,164$ ], ou uma interação entre ECI e tratamento [ $F(1,16)=2,83$ ,  $p=0,112$ ]. Além disso, foram encontrados 8 (17%) animais na fase de pró-estro, 6 (12,8%) na fase estro, 14 (29,8%) na fase metaestro e 15 (31,9%) na fase diestro do ciclo estral. No entanto, não foram observadas diferenças no ciclo estral dos animais em comparação com qualquer análise bioquímica e comportamental (dados não mostrados).

**Figura 2: Efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias no peso corporal, peso da adrenal e níveis séricos de glicose**



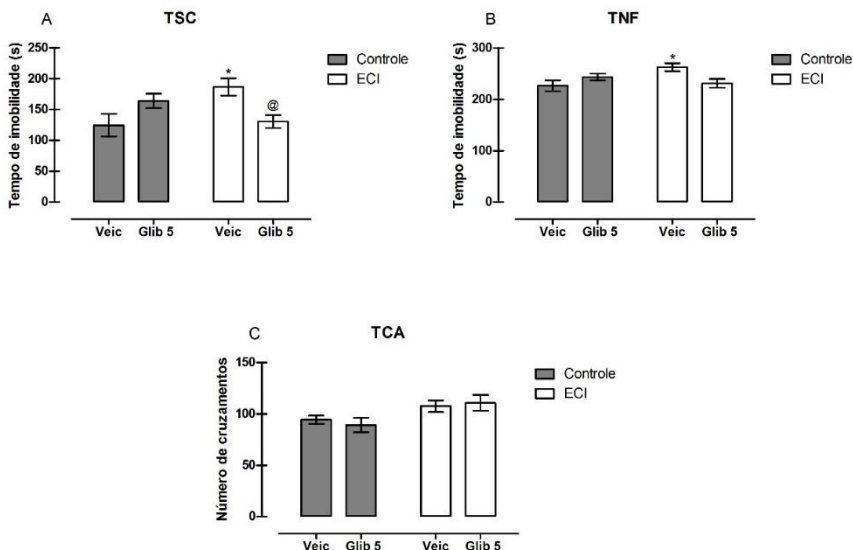
**Legenda:** O peso corporal (g) foi mensurado no dia de início do protocolo de ECI (basal) e posteriormente no dia 7, dia 14 e dia 21 ( $n=10$  por grupo, Figura A). O peso da adrenal (mg) foi calculado por uma razão entre o peso do animal e o peso da adrenal após o término do protocolo de ECI ( $n=5$  por grupo, figura B). Os níveis séricos de glicose foram avaliados em um grupo de animais com 12 horas de jejum ( $n=5$  por grupo, figura C). Os dados estão representados como média $\pm$ E.P.M. \* representa  $p<0,05$  comparado ao grupo Controle + Veic e # representa  $p<0,05$  comparado ao grupo Controle + Glib 5. *Glib 5*: Glibenclamida 5 mg/kg; *ECI*: Estresse crônico imprevisível; *Veic*: Veículo.

### 2.1.2. Comportamento associado à depressão e locomoção

Com a finalidade de verificar possíveis alterações comportamentais associadas à depressão e os efeitos da administração sistêmica de glibenclamide por 21 dias nos animais submetidos ao ECI, foram realizados o teste de suspensão pela cauda e o teste do nado

forçado. A Figura 3A mostra os resultados para o teste de suspensão pela cauda, onde a ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas para o efeito do ECI [ $F(1,35)=1,134$ ,  $p=0,294$ ] ou para o efeito do tratamento [ $F(1,35)=0,392$ ,  $p=0,535$ ]. No entanto, uma interação significativa entre ECI e o tratamento foi observada [ $F(1,35)=12,58$ ,  $p=0,001$ ]. A análise de *post-hoc* comparando os quatro grupos experimentais indicou que os animais submetidos ao ECI apresentaram maior tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo controle ( $p=0,020$ ), além disso, o tratamento com glibenclamida diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais estressados ( $p=0,019$ , comparado com ECI + Veic). A Figura 3B exibe os resultados para o teste do nado forçado. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas para o ECI [ $F(1,34)=1,89$ ,  $p=0,178$ ] ou para o tratamento [ $F(1,34)=0,73$ ,  $p=0,400$ ]. No entanto, foi observada uma interação significativa entre ECI e o tratamento [ $F(1,34)=7,89$ ,  $p=0,008$ ]. A análise de *post-hoc* utilizada para comparações múltiplas entre os quatro grupos experimentais indicou que os animais submetidos ao ECI e tratados com veículo tiveram um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle + Veic ( $p=0,027$ ) e este efeito foi parcialmente prevenido no grupo de ECI tratado com glibenclamida ( $p=1,00$  quando comparado ao grupo Controle + Veic e  $p=0,084$  quando comparado ao grupo ECI + Veic). Os resultados apresentados na Figura 3C mostram a locomoção espontânea dos animais analisados no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do ECI [ $F(1,34)=6,63$ ,  $p=0,014$ ], mas nenhum efeito para o tratamento com glibenclamida [ $F(1,34)=0,19$ ,  $p=0,665$ ] ou para a interação entre ECI e o tratamento [ $F(1,34)=0,12$ ,  $p=0,731$ ]. Nenhuma diferença nos grupos experimentais foi encontrada na análise de *post-hoc* de Bonferroni.

**Figura 3: Efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias nos comportamentos associados à depressão e locomoção espontânea**



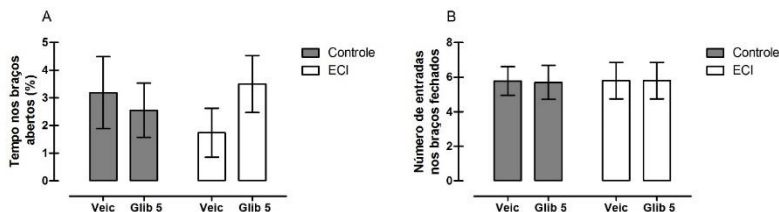
**Legenda:** O tempo de imobilidade foi avaliado no TSC (Controle + Veic, n=9; Controle + Glib 5, n=9; ECI + Veic, n=10; ECI + Glib 5, n=12) e no TNF (Controle + Veic, n=10; Controle + Glib 5, n=9; ECI + Veic, n=10; ECI + Glib 5, n=9), demonstrados em A e B, respectivamente. A locomoção espontânea (C) foi avaliada pelo número de cruzamentos dos quadrantes do TCA (Controle + Veic, n=9; Controle + Glib 5, n=9; ECI + Veic, n=10; ECI + Glib 5, n=10). Os dados estão representados como média±E.P.M. @ representa  $p < 0,05$  comparado ao grupo Controle + Veic e # representa  $p < 0,05$  comparado ao grupo ECI + Veic. Glib 5: Glibenclamida 5 mg/kg; ECI: Estresse crônico imprevisível; Veic: Veículo; TSC: Teste de suspensão pela cauda; TNF: Teste do nado forçado; TCA: Teste do campo aberto.

### 2.1.3. Comportamentos relacionados à ansiedade

Os resultados da Figura 4A mostram os efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida nos comportamentos relacionados à ansiedade, avaliados pela % de tempo gasto nos braços abertos do teste do labirinto em cruz elevado. A ANOVA de duas vias revelou que não há um efeito significativo para o ECI [ $F(1,35)=0,06$ ,  $p=0,813$ ], para o tratamento [ $F(1,35)=0,29$ ,  $p=0,596$ ] ou para a interação entre ECI e o tratamento [ $F(1,35)=1,31$ ,  $p=0,260$ ]. Adicionalmente, a Figura 4B

demonstra o número de entradas nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado, outra avaliação de comportamento ambulatorial. Como revelado pela ANOVA de duas vias, não foram observadas diferenças de efeito do ECI [ $F(1,35)=0,003$ ,  $p=0,951$ ], do tratamento [ $F(1,35)=0,001$ ,  $p=0,968$ ] ou uma interação entre o ECI e o tratamento [ $F(1,35)=0,001$ ,  $p=0,968$ ].

**Figura 4. Efeitos do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias no comportamento associado à ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado**



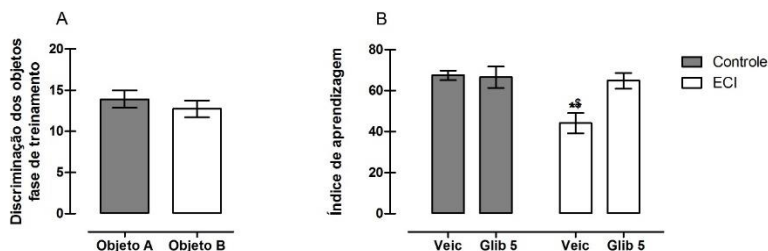
**Legenda:** A % de tempo nos braços abertos (A) do teste do labirinto em cruz elevado foi calculada usando o tempo total nos braços abertos + o tempo total nos braços fechados igual a 100%. Esse parâmetro foi considerado um indicativo de comportamento ansiolítico (Controle + Veic,  $n=9$ ; Controle + Glib 5,  $n=10$ ; ECI + Veic,  $n=10$ ; ECI + Glib 5,  $n=10$ ). O número de entradas nos braços fechados do teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado como um indicativo de locomoção espontânea (Controle + Veic,  $n=10$ ; Controle + Glib 5,  $n=10$ ; ECI + Veic,  $n=10$ ; ECI + Glib 5,  $n=10$ ). Os dados estão representados como média±E.P.M. *ECI: Estresse crônico imprevisível; Veic: Veículo; Glib 5: Glibenclamida 5 mg/kg.*

#### 2.1.4. Memória espacial

Os resultados apresentados na Figura 5A não mostram diferenças na exploração entre o objeto A e o objeto B na sessão de treinamento do teste de realocação de objetos ( $t(78)=0,810$ ,  $p=0,420$ ). No entanto, como demonstrado na Figura 5B, quando os animais foram expostos à sessão de teste, 180 minutos após o treinamento, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o ECI sobre os índices de aprendizagem dos animais [ $F(1,35)=8,62$ ,  $p=0,005$ ], para o tratamento [ $F(1,35)=5,40$ ,  $p=0,026$ ], e uma interação significativa entre o ECI e o tratamento [ $F(1,35)=6,43$ ,  $p=0,015$ ]. A análise de *post-hoc* comparando os quatro grupos experimentais indicou que os animais submetidos ao ECI apresentaram uma redução significativa no índice de aprendizagem quando comparados aos controles ( $p=0,002$ , utilizando o teste *post-hoc*

de Bonferroni) e o tratamento com glibenclamida foi capaz de prevenir a diminuição do índice de aprendizagem nos animais do grupo ECI + Glib 5 ( $p=0,01$  comparado ao grupo ECI + Veic, utilizando o teste *post-hoc* de Bonferroni).

**Figura 5. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias na memória espacial avaliada no teste de realocação de objetos**



**Legenda:** O tempo gasto explorando o objeto A e o objeto B foi avaliado na fase de treinamento do teste de realocação de objetos (A). O tempo gasto explorando o objeto realocado na fase de teste do teste de realocação de objetos foi avaliado (B), (Controle + Veic,  $n=10$ ; Controle + Glib 5,  $n=10$ ; ECI + Veic,  $n=10$ ; ECI + Glib 5,  $n=9$ ). Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa  $p<0,05$  comparado ao grupo Controle + Veic e  $^{\$}$  representa  $p<0,05$  comparado ao grupo ECI + Glib 5. *Glib 5: Glibenclamida 5 mg/kg; ECI: Estresse crônico imprevisível; Veic: Veículo.*

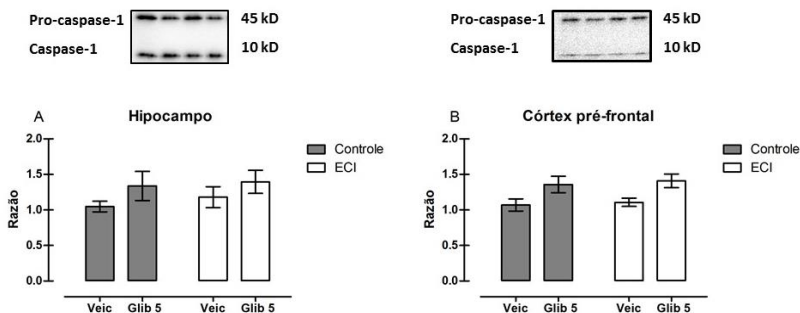
## 2.2. Alterações neuroquímicas

### 2.2.1. Níveis de caspase-1 e pró-caspase-1

Para inferir uma possível ativação da via mediada pelo inflamassoma NLRP3, a Figura 6 apresenta uma razão entre os níveis proteicos obtidos pela avaliação da imunoreatividade da caspase-1 clivada (p10) e da pró-caspase-1 (p45) no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais submetidos ao ECI e tratados com glibenclamida. A ANOVA de duas vias demonstra que não há um efeito significativo do ECI [ $F(1,24)=0,368$ ,  $p=0,549$ ] ou do tratamento [ $F(1,24)=2,713$ ,  $p=0,112$ ] e também não há uma interação significativa entre o ECI e o tratamento com glibenclamida [ $F(1,24)=0,054$ ,  $p=0,817$ ] sobre os níveis de caspase-1 no hipocampo (Figura 6A). Por outro lado, a ANOVA de duas vias não demonstrou um efeito significativo para o ECI [ $F(1,24)=0,240$ ,  $p=0,628$ ], porém, mostrou um efeito significativo do tratamento com glibenclamida [ $F(1,24)=10,34$ ,  $p=0,003$ ] sobre os níveis

de caspase-1 no córtex pré-frontal. Nenhuma interação significativa foi observada entre o ECI e o tratamento com glibenclâmida [ $F(1,24)=0,006$ ,  $p=0,935$ ]. A imunorreatividade para a caspase-1 e para a pró-caspase-1 não foi significativamente diferente entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

**Figura 6. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclâmida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias nos níveis de caspase-1**



**Legenda:** Os níveis da pró-caspase-1 e da caspase-1 clivada no hipocampo ( $n=7$  por grupo) e no córtex pré-frontal ( $n=7$  por grupo) foram analisados nos diferentes grupos experimentais. O imunocônteuído das proteínas foi corrigido através da determinação das proteínas totais das bandas reveladas pelo corante Ponceau S. e uma razão entre a DO da banda de caspase-1 clivada / DO da banda de pró-caspase-1 foi determinada e apresentada. Os dados estão representados como média $\pm$ E.P.M. *ECI: Estresse crônico imprevisível; Veic: Veículo; Glib 5: Glibenclâmida 5 mg/kg; DO: Densidade Óptica.*

### 2.2.2. Níveis de monoaminas

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram os níveis dos neurotransmissores monoaminérgicos no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais submetidos ao ECI e tratados com glibenclâmida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias. A ANOVA de duas vias demonstra que não há um efeito significativo do ECI [ $F(1,25)=0,847$ ,  $p=0,366$ ] e do tratamento [ $F(1,25)=1,178$ ,  $p=0,288$ ] e também não há uma interação significativa entre o ECI e o tratamento com glibenclâmida [ $F(1,25)=0,328$ ,  $p=0,572$ ] sobre os níveis hipocâmpais de noradrenalina. Também não observou-se um efeito significativo para o ECI [ $F(1,25)=1,642$ ,  $p=0,212$ ] e para o tratamento [ $F(1,25)=1,491$ ,  $p=0,233$ ] ou uma interação significativa entre o ECI e o tratamento com glibenclâmida [ $F(1,25)=3,177$ ,  $p=0,086$ ] sobre os níveis hipocâmpais de dopamina. Além disso, a ANOVA de



duas vias não apontou um efeito significativo para o ECI [F(1,25)=0,322, p=0,575], para o tratamento com glibenclamida [F(1,25)=1,575, p=0,221] ou uma interação significativa entre as variáveis [F(1,25)=1,490, p=0,233] em relação aos níveis hipocâmpais de serotonina, demonstrando que o ECI e o tratamento com glibenclamida não modulam os níveis de neurotransmissores monoaminérgicos no hipocampo.

Por outro lado, no córtex pré-frontal observou-se um efeito significativo do ECI [F(1,23)=58,8, p<0,0001] e do tratamento [F(1,23)=10,90, p=0,003], contudo não há uma interação significativa entre ECI e tratamento [F(1,23)=0,8, p=0,388] para os níveis de noradrenalina. A análise de *post-hoc* de Bonferroni indica que o ECI aumentou os níveis de noradrenalina no córtex pré-frontal quando comparado ao grupo Controle + Veic (p<0,0001). Além disso, o tratamento com glibenclamida aumentou os níveis de noradrenalina comparado ao controle + Veic (p=0,046). Adicionalmente, a ANOVA de duas vias demonstrou que há um efeito significativo do ECI [F(1,23)=8,04, p=0,009], mas não do tratamento [F(1,23)=2,98, p=0,097] ou da interação entre ECI e o tratamento [F(1,23)=2,18, p=0,152] para os níveis de dopamina no córtex pré-frontal. Quando feita a comparação entre os diferentes grupos pela análise de *post-hoc* de Bonferroni, observa-se que o grupo ECI apresentou menores níveis de dopamina quando comparados aos animais do grupo Controle + Veic (p=0,042), e o tratamento com glibenclamida nos animais estressados preveniu parcialmente essa redução (p=1,00, comparado com o grupo Controle + Glib 5 e p=0,119 quando comparado ao grupo ECI + Veic). Por fim, não observamos nenhum efeito significativo para o ECI [F(1,23)=0,479, p=0,495], para o tratamento [F(1,23)=0,392, p=0,537] ou para uma interação entre ECI e o tratamento [F(1,23)=0,701, p=0,411] nos níveis de serotonina no córtex pré-frontal dos animais.

Assim, podemos concluir que com relação aos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos os resultados mostram que tanto o ECI quanto o tratamento com glibenclamida causam um aumento da noradrenalina no córtex pré-frontal, um efeito que não é potencializado no grupo ECI + glibenclamida. Além disso, o ECI diminui os níveis de dopamina no córtex pré-frontal, um efeito que é parcialmente prevenido pelo tratamento com glibenclamida por 21 dias. Os níveis de serotonina no córtex pré-frontal ou de qualquer neurotransmissor monoaminérgico no hipocampo não foram alterados pelo ECI ou pelo tratamento.

**Tabela 2. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida sobre os níveis de neurotransmissores monoaminérgicos**

Grupos experimentais	Neurotransmissores		
	<i>Hipocampo</i>	<i>Noradrenalina</i>	<i>Serotonina</i>
<b>Controle + Veic</b>	59,00±0,615	52,54±0,44	207,7±8,96
<b>Controle + Glib 5</b>	59,73±0,92	52,58±0,615	202,6±9,77
<b>ECI + Veic</b>	56,88±2,23	50,05±1,98	180,2±9,54
<b>ECI + Glib 5</b>	59,24±0,917	53,49±1,58	207,1±7,04
<i>Cortex pré-frontal</i>	<i>Noradrenalina</i>	<i>Serotonina</i>	<i>Dopamina</i>
<b>Controle + Veic</b>	93,23±018	84,27±0,29	214,1±7,34
<b>Controle + Glib 5</b>	<b>94,14±0,17*</b>	84,72±0,20	202,6±9,77
<b>ECI + Veic</b>	<b>95,08±0,18*</b>	87,57±3,55	<b>180,2±9,53*</b>
<b>ECI + Glib 5</b>	<b>95,60±0,32*#</b>	84,41±0,36	207,1±7,04

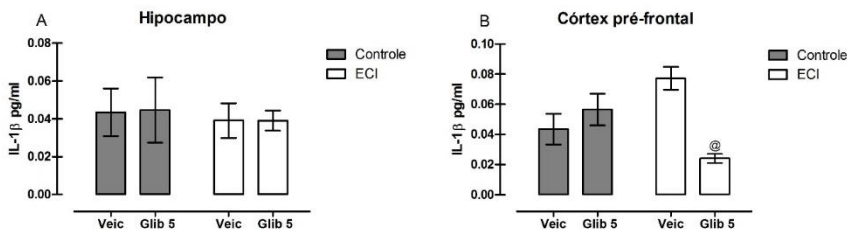
**Legenda:** A concentração de noradrenalina, serotonina e dopamina foi avaliada no hipocampo (Controle + Veic, n=7; Controle + Glib, n=7; ECI + Veic, n=8; ECI + Glib, n=7) e no córtex pré-frontal (Controle + Veic, n=6; Controle + Glib, n=7; ECI + Veic, n=8; ECI + Glib, n=6) dos animais controle ou submetidos ao ECI e ao tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o. por 21 dias) ou veículo. Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa  $p < 0,05$  comparado ao Controle+Veic; # representa  $p < 0,05$  comparado ao Controle + Glib 5. *ECI: Estresse crônico imprevisível; Veic: Veículo; Glib 5: Glibenclamida 5 mg/kg.*

### 2.3. Alterações inflamatórias

A Figura 7 apresenta os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao ECI e tratados com glibenclamida por 21 dias. A análise por ANOVA de duas vias demonstra que não há um efeito significativo para o ECI [F(1,16)=0,186,  $p=0,671$ ], para o tratamento com glibenclamida [F(1,16)=0,002,  $p=0,963$ ] ou para uma interação entre o ECI e o tratamento [F(1,16)=0,003,  $p=0,955$ ] sobre os níveis hipocampais de IL-1 $\beta$  (Figura 7A). Na Figura 7B observa-se os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal. A ANOVA de duas vias revelou que não há um efeito significativo do ECI [F(1,10)=0,03,  $p=0,952$ ], mas observa-se uma tendência para um efeito significativo do tratamento [F(1,10)=4,071,  $p=0,071$ ] e há uma interação significativa entre o ECI e o tratamento com glibenclamida [F(1,10)=11,046,  $p=0,007$ ]. Uma comparação entre os grupos experimentais realizada pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni mostra que o tratamento com glibenclamida diminui significativamente

( $p=0,028$ ) os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao ECI.

**Figura 7. Efeito do ECI e do tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o.) por 21 dias sobre os níveis de IL-1 $\beta$**



**Legenda:** Níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo (Controle + Veic, n=6; Controle + Glib 5, n=4; ECI + Veic, n=4; ECI + Glib 5, n=6) e no córtex pré-frontal (Controle + Veic, n=3; Controle + Glib 5, n=5; ECI + Veic, n=5; ECI + Glib 5, n=2) dos animais controle ou submetidos ao ECI e ao tratamento com glibenclamida (5 mg/kg, v.o. por 21 dias) ou veículo (Figuras A e B, respectivamente). Os dados estão representados como média $\pm$ E.P.M. @ representa  $p<0,05$  comparado ao ECI + Veic. ECI: *Estresse crônico imprevisível*; Veic: *Veículo*; Glib 5: *Glibenclamida 5 mg/kg*.

### 3. Discussão

É amplamente aceito que modelos animais de estresse em roedores são capazes de induzir diferentes alterações comportamentais e neuroquímicas relevantes para o estudo do TDM. O principal achado do presente estudo foi que o tratamento sistêmico com glibenclamida por 21 dias preveniu o comportamento depressivo e o prejuízo de memória induzidos pelo ECI em camundongos fêmeas. Além disso, a maior parte das alterações neuroquímicas induzidas pelo estresse foram observadas no córtex pré-frontal, incluindo um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e noradrenalina, e uma redução nos níveis de dopamina. O tratamento com glibenclamida foi capaz de normalizar os níveis de IL-1 $\beta$  e dopamina no córtex pré-frontal, sugerindo que esta comunicação neuroimune pode ser um dos mecanismos associados aos efeitos comportamentais observados.

O protocolo de ECI induziu efetivamente mudanças nos parâmetros fisiológicos, como a redução do peso corporal. Uma diminuição no ganho de peso dos animais submetidos ao ECI já foi relatada anteriormente (VIEIRA *et al.*, 2018; ABDUL SHUKKOOR *et*

*al.*, 2016), e pode estar relacionada à ação dos glicocorticoides sobre a mobilização dos estoques de energia e aumento da gliconeogênese hepática (HARRIS, 2015). Curiosamente, a redução do peso observada no final da segunda semana de estresse foi normalizada ao final do protocolo. O tratamento com glibenclamida atenuou o efeito do estresse crônico no ganho de peso na terceira semana, mas esses resultados não foram significativos. Com base nesses achados, é possível especular que os animais submetidos ao ECI tenham uma adaptação após a segunda semana. Esta ideia é apoiada pelos resultados que não mostram alterações no peso da suprarrenal no final do protocolo. Entretanto, uma avaliação adicional dos níveis de corticosterona na segunda e terceira semana poderia ser importante para determinar se o ECI por três semanas foi suficiente para induzir mudanças sustentadas no eixo HPA.

O estresse crônico atua como fator de predisposição no aparecimento do TDM em humanos (MONROE *et al.*, 2009; STROUD *et al.*, 2008). De fato, vários estudos indicam que modelos animais de estresse crônico são capazes de induzir comportamentos depressivos em roedores (JOËLS *et al.*, 2004; KUBERA *et al.*, 2001; MOREAU *et al.*, 1995; D'AQUILA, BRAIN e WILLNER, 1994). Dentre esses modelos, o ECI é provavelmente o mais translacional para os humanos (MCEWEN *et al.*, 2000), uma vez que ratos ou camundongos expostos ao ECI desenvolvem uma série de alterações comportamentais, morfológicas e hormonais típicas do TDM (WILLNER, 2016; HILL *et al.*, 2012).

Neste estudo, o tratamento sistêmico com glibenclamida durante o protocolo de ECI não produziu um efeito antidepressivo per se no TNF e no TSC, mas preveniu o efeito depressivo induzido pelo ECI nos dois testes. Estes resultados corroboram um estudo anterior do nosso grupo que demonstrou que a administração intracerebroventricular de glibenclamida causa um efeito antidepressivo em camundongos submetidos ao TNF (KASTER *et al.*, 2007). Além disso, SU e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento com uma dose maior de glibenclamida (10 mg/kg, por 12 semanas) também foi capaz de prevenir o comportamento depressivo no TSC e anedônico no teste de preferência por sacarose induzidos por 12 semanas de estresse crônico moderado em camundongos C57BL/6J machos.

A glibenclamida é um agente hipoglicêmico oral usado para tratar a diabetes mellitus por meio do bloqueio dos canais de potássio sensíveis ao ATP (Sur1-Kir6.2) nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, levando à despolarização da membrana plasmática, ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem e liberação de insulina (ASFCROFT,

2006). É importante ressaltar que, no estudo de SU e colaboradores (2017), alterações periféricas que sugerem resistência à insulina foram observadas nos animais após 12 semanas de estresse. No presente estudo não foram detectados sinais de alterações na glicemia dos animais submetidos ao ECI ou tratados com glibenclamida. Estes resultados podem sugerir que os efeitos da glibenclamida não são secundários à normalização do metabolismo periférico da glicose e insulina. Além de seus efeitos hipoglicemiantes, a glibenclamida é capaz de inibir o inflamassoma NLRP3 e ainda a secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos (LAMKANFI *et al.*, 2009). A inibição do inflamassoma NLRP3 foi descrita como um potencial mecanismo de efeito antidepressivo tanto em estudos pré-clínicos quanto em estudos clínicos (KAUFMANN *et al.*, 2017). Nesse sentido, alguns estudos surgiram demonstrando o papel da inibição do NLRP3 induzida pela glibenclamida na melhora de várias condições patológicas inflamatórias, como a disfunção miocárdica na sepse (ZHANG *et al.*, 2014), infecção por cistite bacteriana (HUGHES *et al.*, 2014), displasia broncopulmonar (LIAO *et al.*, 2015), doença renal (DIWAN, GOBE e BROWN, 2014) e resistência à insulina (HENRIKSBO *et al.*, 2014). De fato, SU e colaboradores (2017) também demonstraram que um dos mecanismos associados aos efeitos comportamentais da glibenclamida é a redução da sinalização do inflamassoma NLRP3 induzida pelo ECI no hipocampo (SU *et al.*, 2017). No presente estudo, não foi encontrado um aumento na sinalização hipocampal do inflamassoma NLRP3 (após analisar as proteínas caspase-1 e IL-1 $\beta$  no hipocampo). Contudo, é importante ressaltar que o protocolo de ECI foi realizado durante 21 dias em fêmeas, enquanto que SU e colaboradores (2017) utilizaram um protocolo de 12 semanas em machos. No entanto, encontramos uma tendência de aumento nos níveis IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal, que pode sugerir uma ativação da via do inflamassoma NLRP3 e o impacto do estresse de 21 dias sobre esta estrutura. Este efeito foi prevenido pelo tratamento com glibenclamida, reforçando seu efeito como inibidor do complexo NLRP3.

Demonstramos que o tratamento com glibenclamida também preveniu o prejuízo de memória induzido pelo ECI em camundongos. É importante notar que a glibenclamida não melhorou a memória nos camundongos controle, mas preveniu os efeitos negativos do ECI. O tratamento com glibenclamida já foi demonstrado melhorar o prejuízo de memória no teste do labirinto aquático de Morris após um modelo de hemorragia subaracnóide em camundongos (TOSUN *et al.*, 2013) e sua administração aguda em camundongos jovens com menos de 3 semanas

sob uma dieta rica em gorduras foi capaz de melhorar o prejuízo de memória observado no teste de realocação de objeto e no teste de reconhecimento do objeto (GAINEY *et al.*, 2016). Em estudos clínicos, a terapia com glibenclamida melhorou parâmetros como escores de inteligência, atenção visual e habilidades motoras em crianças com diabetes neonatal (BELTRAND *et al.*, 2015).

Dados clínicos mostram que a coexistência do TDM com sintomas de ansiedade é mais uma regra do que uma exceção. De fato, um efeito ansiolítico já foi demonstrado após o tratamento com glibenclamida em um modelo de dieta hiperlipídica (GAINEV *et al.*, 2016). Nossos resultados não mostraram um efeito ansiogênico do ECI, já demonstrado na literatura (MITRA *et al.*, 2005). Nem o ECI nem o tratamento com glibenclamida foram capazes de mudar os comportamentos relacionados com a ansiedade dos animais. Embora os efeitos cognitivos do estresse estejam geralmente associados à plasticidade de áreas como o hipocampo e áreas corticais, é provável que os aspectos afetivos dos transtornos relacionados ao estresse, como o aumento da ansiedade, envolvam a amígdala, que desempenha um papel crucial no processamento de experiências aversivas (LABAR, 2007).

Ao avaliar os níveis de monoaminas nos animais submetidos ao ECI foi possível observar um aumento significativo de noradrenalina no córtex pré-frontal. Sabe-se que o estresse aumenta a atividade dos neurônios do locus coeruleus, a principal fonte de noradrenalina no córtex dos mamíferos (SEKI, YOSHIDA, JAISWAL, 2018) e essa ativação leva a um aumento na liberação de noradrenalina por todo o encéfalo, incluindo no córtex pré-frontal (CHANDLER *et al.*, 2014). Não obstante, a ativação do locus coeruleus contribui para a ativação do eixo HPA levando a um aumento na produção de cortisol e desempenhando um importante papel na indução do TDM pelo estresse, pois os neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus têm como alvo os neurônios que produzem o hormônio CRH (ATZORI *et al.*, 2016). Por outro lado, um aumento na inflamação também pode aumentar os níveis de noradrenalina (CHANDLER *et al.*, 2014). De fato, a noradrenalina está relacionada à regulação da cognição, motivação e interação social e diversos estudos observaram que há um aumento na liberação de noradrenalina e uma alta responsividade do locus coeruleus em modelos de estresse que exibem comportamentos depressivos (CHANDLER *et al.*, 2014; KREINER *et al.*, 2011; TANAKA *et al.*, 2000).

Por outro lado, o estresse crônico pode induzir uma neurodegeneração no locus coeruleus o que pode implicar em um dano

nos neurônios noradrenérgicos e consequentemente uma diminuição nos níveis de noradrenalina liberados, podendo resultar em comportamentos depressivos (CHANDLER *et al.*, 2014; MORET e BRILEY, 2011). De fato, a depleção experimental de noradrenalina no encéfalo resulta no retorno dos sintomas depressivos após um tratamento efetivo com antidepressivos que atuam sobre o sistema noradrenérgico (MORET e BRILEY, 2011). Nesse sentido, o estresse crônico utilizado no presente trabalho não levou a uma diminuição dos níveis de noradrenalina no córtex pré-frontal, o que talvez possa ocorrer com o uso de um protocolo de estresse mais duradouro.

Além disso, foi possível observar uma diminuição nos níveis de dopamina nos animais estressados. A disfunção do sistema dopaminérgico está implicada em problemas de motivação, processos hedônicos como prazer e recompensa e durante o TDM tem um papel importante nas recaídas dos sintomas depressivos (PAULINE e GRACE, 2017). De fato, o estresse crônico diminui os níveis de dopamina em diferentes regiões encefálicas (PANI, A PORCELLA e GESSA, 2000). Além disso, o próprio inflamassoma NLRP3 foi demonstrado ser inibido pela dopamina via receptores D1 de dopamina em células de medula óssea estimuladas com LPS (YAN *et al.*, 2015). Um aumento na inflamação parece influenciar as enzimas da via monoaminérgica, uma vez que foi demonstrado que o tratamento com IL-1 $\beta$  pode aumentar a expressão da enzima tirosina hidroxilase (SIRIVELU *et al.*, 2012). Isso sugere que no presente estudo, o ECI pode influenciar a atividade desta enzima deslocando a dopamina para a produção de noradrenalina e a diminuição da dopamina leva a uma falha na inibição do inflamassoma NLRP3, contudo, esses dados precisam ser melhor investigados no futuro. Curiosamente, o tratamento com glibenclamida por 21 dias aumentou os níveis de noradrenalina no córtex pré-frontal dos animais controles + Glib 5, sugerindo que a glibenclamida parece atuar sobre as vias noradrenérgicas e, nesse caso, potencializando a liberação desse neurotransmissor. Por outro lado, o tratamento com glibenclamida preveniu a diminuição nos níveis de dopamina induzidos pelo ECI no córtex pré-frontal.

Assim, os dados sugerem que o ECI e o tratamento com glibenclamida por 21 dias modulam a inflamação e vias dopaminérgicas e noradrenérgicas no córtex pré-frontal de camundongos fêmeas. Contudo, ainda não está claro se o ECI é capaz de induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 no córtex pré-frontal e uma avaliação mais completa da via, incluindo as proteínas NLRP3, ASC, NF $\kappa$ B e TLR-4 ajudariam a esclarecer sua contribuição para os efeitos comportamentais

observados. Além disso, o tratamento com a glibenclamida se mostrou eficaz na prevenção dos comportamentos induzidos pelo ECI, contudo, seu mecanismo de ação e sua interação com o sistema monoaminérgico precisam ser investigados.



## **2. Estudo em humanos: Efeito do polimorfismo de troca única rs10754558 no gene do inflamassoma *NLRP3*, níveis séricos de interleucina-1 $\beta$ e prevalência do Transtorno Depressivo Maior**

Nas últimas três décadas, foi descrita uma interação entre a ativação do sistema imune e mudanças nos circuitos encefálicos relacionados ao humor, cognição e respostas hedônicas (WOHLEB *et al.*, 2016; MILLER *et al.*, 2008). Após uma situação estressante, a ativação do sistema imune inato pode ser neuroprotetora ou neurotóxica, dependendo da persistência do evento inflamatório e também da resiliência individual (MENARD *et al.*, 2017). Dados de estudos pré-clínicos mostram que as diferenças individuais nas respostas imunes estão associadas à suscetibilidade versus resiliência ao estresse social crônico e, possivelmente, ao TDM (MENARD *et al.*, 2017). Neste cenário, os PRRs parecem desempenhar um papel importante na interação recíproca entre estresse, inflamação e respostas comportamentais. Esses receptores são primariamente expressos por células imunes periféricas e dentro do SNC em astrócitos, oligodendrócitos, neurônios e microglia, atuando através do reconhecimento de moléculas externas como os PAMPs e moléculas associadas a danos celulares, os DAMPs (KIGERL *et al.*, 2014; MARTINON *et al.*, 2002).

Os PRRs citosólicos NLRs estão envolvidos na montagem de complexos proteicos citosólicos conhecidos como inflamassomas. O complexo inflamassoma *NLRP3* é responsável, em última instância, pela clivagem proteolítica e pela maturação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18, o que promove respostas imunes inatas associadas à infecção e inflamação (KAUFMANN *et al.*, 2017). Dados recentes da literatura demonstraram que a sinalização mediada pela ativação do inflamassoma *NLRP3* pode ser uma ligação entre a resposta ao estresse e a ativação neuroimune, fatores que são chave na patogênese do TDM (ALCOCER-GOMEZ *et al.*, 2017; ALCOCER-GOMEZ & CORDERO, 2014; IWATA *et al.*, 2013). Estudos pré-clínicos demonstraram um aumento da expressão e ativação do inflamassoma *NLRP3* e um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  em diferentes áreas encefálicas de roedores submetidos ao estresse (KAUFMANN *et al.*, 2017; MILLER e RAISON, 2016). Do ponto de vista clínico, níveis elevados de IL-1 $\beta$  e IL-18 já foram encontrados em alguns subgrupos de pacientes com TDM em comparação com indivíduos controle (SYED *et al.*, 2018; MOTA *et al.*, 2010; DOWLATI *et al.*, 2010) e níveis elevados das proteínas ASC e caspase-1 foram encontrados no plasma de pacientes com TDM (SYED

*et al.*, 2018). Além disso, existem dois estudos mostrando uma ativação do complexo NLRP3 em células imunes periféricas de pacientes com TDM (ALCOCER-GOMEZ *et al.*, 2017; ALCOCER-GOMEZ *et al.*, 2014). ALCOCER-GOMEZ e colaboradores (2017) demonstraram que o aumento na expressão da via do inflamassoma NLRP3 observado em indivíduos com TDM não tratados é revertido após o tratamento com fármacos antidepressivos de diferentes classes, sugerindo um papel para essa via como um mecanismo de reposta terapêutica. Portanto, diferenças genéticas nessa via podem ter um papel importante na ativação de respostas imunes após o estresse e, possivelmente, na suscetibilidade ao TDM e outras condições psiquiátricas (IWATA *et al.*, 2013).

Foi observado que um polimorfismo de troca única no gene que codifica a proteína NLRP3, o qual está localizado na posição 1q44 do genoma, está associado a várias condições inflamatórias (ADDOBBATI *et al.*, 2018; RHEINHEIMER *et al.*, 2017; HANAIEI *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2015; HITOMI *et al.*, 2009). Particularmente, uma troca de C/G foi identificada na região 3'UTR do éxon 11 (SNP rs10754558) (HITOMI *et al.*, 2009). Resultados de ensaios com lucifarese em células THP-1 transfectadas com constructos específicos dos alelos, sugeriram que o alelo G deste polimorfismo estava associado com alta estabilidade do RNAm NLRP3 quando comparado ao alelo C (HITOMI *et al.*, 2009). De fato, o alelo G do SNP rs10754558 é considerado um alelo de risco para várias doenças que possuem um componente inflamatório, como doenças autoimunes e crônicas, resistência à insulina e obesidade (ADDOBBATI *et al.*, 2018; HANAIEI *et al.*, 2017; RHEINHEIMER *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2015). Além disso, a presença do alelo G associado a um alelo de risco para APOE ε4 (apolipoproteína E) aumentou o risco da doença de Alzheimer, sugerindo uma possível interação desses dois polimorfismos como fatores de risco para essa condição neurodegenerativa (TAN *et al.*, 2013). No entanto, nenhum estudo de associação foi realizado até o momento avaliando polimorfismos no complexo NLRP3 e transtornos psiquiátricos.

Tendo em vista que eventos estressores são importantes fatores ambientais na etiologia do TDM e que a presença de uma resposta inflamatória disfuncional é observada na maioria dos pacientes com TDM (SYED *et al.*, 2018), a capacidade do complexo inflamassoma NLRP3 em responder ao estresse e cessar sua ação uma vez que o estímulo estressor é removido pode representar um mecanismo importante envolvido na suscetibilidade ao TDM. Nesse sentido, o

presente trabalho questionou se o SNP rs10754558 (C/G) no gene *NLRP3* está associado a mudanças nos níveis periféricos de IL-1 $\beta$ , principal citocina produzida em resposta à ativação do complexo do inflamassoma NLRP3, e à prevalência de TDM em um estudo transversal de base populacional.

## **1. Métodos**

### **1.1. Desenho do estudo e seleção dos participantes**

Foi realizado um estudo transversal de base populacional que incluiu 1.110 indivíduos com idade entre 18 e 35 anos residentes na zona urbana da cidade de Pelotas, RS, Brasil. Os indivíduos foram selecionados de junho de 2011 a maio de 2013. A seleção foi feita por conglomerados, de acordo com os setores censitários da cidade de Pelotas e considerando uma população de 97.000 indivíduos nesta faixa etária. Dos 495 setores censitários, foram sorteados 82 setores para inclusão aleatória no estudo. Após a identificação dos setores de interesse, os domicílios receberam visitas matinais e os indivíduos que preenchiam os critérios de inclusão e que aceitaram participar do estudo foram selecionados para coleta das informações sociodemográficas, clínicas e coleta das amostras biológicas. Variáveis como etnia, uso de medicação psiquiátrica e comorbidades clínicas foram autorrelatadas. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela equação: peso (kg) / altura (m<sup>2</sup>). Os indivíduos foram diagnosticados com o TDM (atual ou passado) através da entrevista estruturada de diagnóstico *Mini International Neuropsychiatric Interview* 5.0 (MINI 5.0, versão brasileira/DSM-5, Medical Outcome Systems Inc., Jacksonville, FL, EUA) de acordo com os critérios do DSM-5. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica de Pelotas (2010/15) e todos os pacientes forneceram um termo de consentimento livre e esclarecido.

### **1.2. Coleta de amostra de sangue**

Após a entrevista, 10 mililitros de sangue foram coletados (8:00-11:00) por punção venosa em um tubo de vácuo livre de anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas (3.500g, à temperatura ambiente) para a coleta dos leucócitos do sangue periférico que foram utilizados para posterior extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) e o soro foi separado e mantido congelado a -80°C até a análise bioquímica.

### 1.3. Genotipagem

A extração de DNA dos leucócitos do sangue periférico ocorreu por meio de procedimento padronizado de acordo com LAHIRI e NURNBERGE (1991). O alelo menor do SNP *NLRP3* rs10754558 (C/G) tem uma frequência de 0,3583 na população europeia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). O SNP foi genotipado usando sondas contendo 40x Human Custom TaqMan Genotyping Assay (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Os iniciadores utilizados foram: 5'-CCG GGT TCA ATC AAT TCT CCT-3' (senso) and 5'-CGG GCG TGG AGG TGC AAT G-3' (anti-senso). Uma sonda alélica foi marcada com fluorocromo VIC e a outra foi marcada com fluorocromo FAM. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando 5 µl de volume de DNA por poço contendo 2 ng de DNA genômico de cada indivíduo, TaqMan Genotyping Master Mix 1x (Applied Biosystems) e Custom TaqMan Genotyping Assay 1x. As placas de 96 poços foram posteriormente posicionadas em um termociclador de PCR em tempo real (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems) e aquecidas por 10 min a 95°C, seguidas por 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 minuto. Os arquivos de dados de fluorescência de cada placa foram analisados usando um software para identificação automática de alelos (SDS 2.0.1; Applied Biosystems).

### 1.4. ELISA

Uma subamostra representativa de 161 indivíduos foi utilizada para a avaliação dos níveis periféricos de IL-1 $\beta$  de acordo com o genótipo e o diagnóstico. O tamanho dessa subamostra foi calculado com base nos valores da média e do desvio padrão dos níveis séricos de IL-1 $\beta$  nos controles e nos indivíduos com TDM, usando um nível de significância ( $\alpha$ ) ajustado em 5% e potência (1- $\beta$ ) definida como 80% através do Programa Openepi (MOTA *et al.*, 2013; HUANG e LEE, 2007). Esses 161 indivíduos foram selecionados considerando a mesma proporção de gênero e etnicidade e divididos em dois grupos, 83 controles e 78 indivíduos com TDM. Os níveis séricos de IL-1 $\beta$  foram mensurados usando kits de imunoenensaio específicos (DuoSet ELISA Development, R & D Systems, Inc., EUA). A placa foi selada com 100 µl 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, pH 7,4) e posteriormente foi bloqueada durante 1h utilizando 200 µl 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 µl 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 avidina-horseradish (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 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a placa foi lida em um espectrofotômetro à 450 nm. O coeficiente de variação intra-ensaio (C.V.) foi inferior a 5% e o ensaio inter-ensaio C.V. foi inferior a 10%. Os valores foram expressos em pg/mL.

### 1.5. Análises estatísticas

As frequências alélicas foram determinadas por contagem gênica, e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificados por meio do teste  $\chi^2$ . Comparações de frequências alélicas e genótípicas entre pacientes com TDM e controles foram avaliadas usando o teste do  $\chi^2$ . As características sociodemográficas segundo o diagnóstico e o genótipo foram analisadas pelo teste do  $\chi^2$ . As variáveis contínuas foram avaliadas usando o teste t de Student, ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni, conforme apropriado. Os níveis de IL-1 $\beta$  apresentaram distribuição não-gaussiana e foram logaritmicamente transformados para realização de análise paramétrica. A magnitude da associação entre os diferentes genótipos e o TDM foi estimada por meio da razão de chances (RC) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%), ajustada pela idade, sexo, tabagismo, etnia, uso de medicação psiquiátrica e TDM através da análise de regressão logística. A correção de Bonferroni foi usada para contabilizar comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas com o software *Statistical Program for Social Sciences* 20.0 (SPSS 20.0) e os dados foram apresentados como média $\pm$ E.P.M. ou porcentagem (%), considerando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## 2. Resultados

Este estudo envolveu um total de 1.100 indivíduos. Destes, 615 (55,9%) eram controles sem diagnóstico de TDM e 485 (44,1%) possuíam diagnóstico de TDM. As informações sociodemográficas

segundo o diagnóstico estão descritas na Tabela 1. Observou-se maior prevalência de TDM em mulheres ( $p<0,001$ ) e entre pessoas que fumam ( $p<0,001$ ). Os indivíduos com diagnóstico de TDM eram ligeiramente mais velhos que os controles ( $p=0,042$ ). Além disso, na população estudada, observou-se uma diferença significativa em relação à classe socioeconômica, com maior prevalência de pacientes com TDM na classe baixa ( $p=0,037$ ). Apesar do baixo uso de medicação psiquiátrica em nossa população, os indivíduos com TDM tiveram maior uso de medicação psiquiátrica quando comparados aos controles ( $p<0,001$ ). Variáveis como IMC ( $p=0,555$ ), etnia autorrelatada ( $p=0,829$ ), presença de doenças clínicas incluindo condições inflamatórias, metabólicas e infecciosas ( $p=0,626$ ) e níveis periféricos de IL-1 $\beta$  ( $p=0,543$ ) não foram diferentes entre indivíduos com TDM e controles.

**Tabela 1. Características sociodemográficas e clínicas de acordo com o diagnóstico para o Transtorno Depressivo Maior**

Características	Transtorno Depressivo Maior		Valor de p
	Não	Sim	
Idade em anos (média $\pm$ E.P.M.)	25,69 $\pm$ 0,21	26,35 $\pm$ 0,23	0,042
Sexo (% mulheres)	307 (49,9)	319 (65,9)	<0,001
Etnia (% caucasiano)	490 (75,3)	369 (76,0)	0,829
Classe socioeconômica			
Baixa	108 (17,6)	111 (23,0)	0,037
Intermediária	310 (50,4)	243 (50,3)	
Alta	197 (32,0)	129 (26,7)	
Uso de tabaco (% sim)	119 (19,4)	139 (28,9)	<0,001
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	26,15 $\pm$ 0,21	25,95 $\pm$ 0,25	0,555
Medicação psiquiátrica	22 (3,6)	52 (10,7)	<0,001
Doenças clínicas (% sim)	73 (11,9)	53 (10,9)	0,626
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	9,97 $\pm$ 1,39	15,02 $\pm$ 3,89	0,543
Total	615 (55,9)	485 (44,1)	

**Legenda:** Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M. ou n (%). \* Os valores de p foram computados usando o teste de  $\chi^2$  ou teste t de Student, como apropriado. Os níveis de IL-1 $\beta$  estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. mas foram analisados após a transformação logarítmica. p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. *TDM: Transtorno Depressivo Maior; IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$ .*

A distribuição dos genótipos de acordo com o diagnóstico é apresentada na Tabela 2. Não foi encontrada associação entre a distribuição dos genótipos e o diagnóstico de TDM (p=0,156). Adicionalmente, ao agrupar o alelo G no modelo dominante (CG/GG) não se observou diferenças do genótipo segundo o TDM (p=0,069). Além disso, após o ajuste para idade, sexo, tabagismo, etnia e uso de medicação psiquiátrica, os genótipos CG e GG permaneceram não associados ao transtorno [RC=1,105 (IC 95% 0,842-1,451), p=0,472] e [RC=0,722 (IC 95% 0,482-1,081), p=0,114], respectivamente, incluindo no modelo dominante [RC=1,007 (IC 95% 0,777-1,304), p=0,960]. Não foram encontradas associações significativas entre genótipo e diagnóstico após estratificação por gênero (dados não mostrados). Além disso, as frequências genotípicas estavam de acordo com as previstas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para o SNP rs10754558 ( $\chi^2=0,37$ , p=0,995).

**Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica de acordo com o diagnóstico para o Transtorno Depressivo Maior**

Transtorno Depressivo Maior					
Características	Não	Sim	Valor de p	RC não ajustada (IC 95%/p)*	RC ajustada (IC 95%/p) <sup>#</sup>
rs10754558 SNP					
Genótipo					
CC	237 (38,5)	192 (39,6)	0,156	1	1
CG	281 (45,7)	236 (48,7)		1,037 (0,802-1,341)/0,784	1,105 (0,842-1,451)/0,472
GG	97 (15,8)	57 (11,8)		0,725 (0,497-1,059)/0,096	0,722 (0,482-1,081)/0,114
Modelo dominante					
CC	237	192	0,069	1	1
CG/GG	(38,5)	(39,6)		0,957 (0,750-1,222)/0,723	1,007 (0,777-1,304)/0,960
	378	293			
	(61,5)	(60,4)			
Alelo					
C	0,614	0,649	0,345		
G	0,238	0,361			

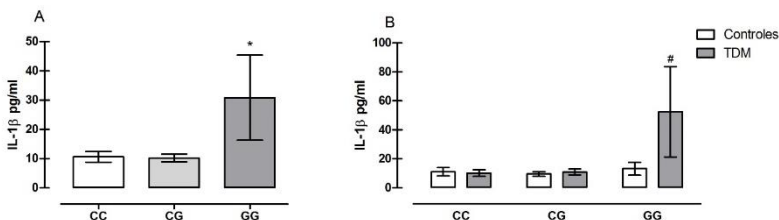
**Legenda:** Os dados estão representados como n(%) ou proporção. \*Os valores de p foram computados usando o teste de  $\chi^2$  comparando pacientes com TDM e controles. <sup>#</sup>Os valores da RC (IC 95%/p) foram obtidos da análise de regressão logística ajustada para idade, sexo, uso de tabaco, etnia e uso de medicação psiquiátrica.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. *TDM: Transtorno Depressivo Maior; RC: Razão de chances.*

Em uma subamostra de 161 indivíduos, os níveis séricos de IL-1 $\beta$  foram avaliados. Como mostrado na Figura 1, a ANOVA de uma via revelou diferenças significativas nos níveis de IL-1 $\beta$  de acordo com o genótipo [F(2,159)=3,63,  $p=0,029$ ]. A análise de *post-hoc* mostrou que os indivíduos com o genótipo GG apresentaram maiores níveis de IL-1 $\beta$  quando comparados aos indivíduos com o genótipo CC. Os níveis séricos de IL-1 $\beta$  não diferiram entre os indivíduos CC e GC (Figura 1A). Adicionalmente, foi avaliada a interação entre genótipo e diagnóstico de TDM em relação aos níveis séricos de IL-1 $\beta$ . A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o genótipo [F(2,155)=1,36,  $p=0,019$ ], mas não para o diagnóstico de TDM [F(2,155)=1,36,  $p=0,146$ ], ou para a interação entre genótipo e diagnóstico [F(2,155)=1,36,  $p=0,260$ ]. A análise de *post-hoc* indicou que os indivíduos diagnosticados com o TDM e portadores do genótipo GG apresentaram níveis séricos de IL-1 $\beta$  mais elevados quando comparados aos indivíduos portadores dos genótipos GC ( $p=0,01$ ) e CC ( $p=0,05$ ) com ou sem diagnóstico de TDM (Figura 1B). Esses resultados



sugerem que, em pacientes com TDM, a presença do genótipo GG está associada a um aumento do perfil inflamatório.

**Figura 1. Níveis periféricos de IL-1 $\beta$  de acordo com o genótipo e diagnóstico**



**Legenda:** Distribuição dos genótipos e níveis séricos de IL-1 $\beta$  (CC, n=60; CG, n=81; GG, n=20, Figura A). Diferenças nos níveis séricos de IL-1 $\beta$  de acordo com os genótipos e diagnóstico de TDM (Controles: CC, n=30; CG, n=42; GG, n=11; TDM: CC, n=30; CG, n=39; GG, n=9, Figura B). Os resultados estão expostos como média $\pm$ E.P.M dos valores previamente transformados logaritmicamente. As diferenças foram analisadas por ANOVA de uma via (A) ou duas vias (B) seguidas pelo teste de *post-hoc* Bonferroni. \*  $p < 0,05$  comparado ao genótipo CC. #  $p < 0,05$  comparado ao genótipo CG e CC em indivíduos controles e pacientes com TDM. TDM: *Transtorno Depressivo Maior*; IL-1 $\beta$ : *Interleucina-1 $\beta$* .

### 3. Discussão

Este é o primeiro estudo que avalia o papel do SNP rs10754558 no gene *NLRP3*, níveis de IL-1 $\beta$  e a prevalência de TDM. No presente estudo, ao avaliar apenas a associação entre o genótipo e o diagnóstico, os resultados não mostraram associação entre o SNP rs10754558 e a prevalência de TDM em uma amostra populacional de 1.100 indivíduos. Além disso, mesmo após a estratificação por gênero, o genótipo não foi associado ao TDM em homens ou mulheres. No entanto, em uma subamostra representativa incluindo 161 indivíduos, apesar dos níveis de IL-1 $\beta$  não serem significativamente diferentes entre os indivíduos com TDM e controles, o alelo G foi associado à altos níveis séricos de IL-1 $\beta$ . Além disso, o diagnóstico de TDM em pacientes com o genótipo GG foi associado com níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  quando comparado com indivíduos com TDM e portadores dos genótipos CC ou CG ou mesmo com indivíduos controles.

O gene *NLRP3* (PYPAF1 ou CIAS1) está localizado no braço longo (q) do cromossomo 1 na posição 44. Aproximadamente 60 SNPs

foram identificados em todo o gene. O alelo G deste SNP já foi associado a diversas doenças inflamatórias comuns, incluindo asma induzida por aspirina (HITOMI *et al.*, 2009), aneurismas da aorta abdominal (RAEDLER, 2011), artrite (ADDOBBATI *et al.*, 2018), doença da artéria coronária (LEVINE *et al.*, 1999), diabetes tipo 2 e resistência à insulina (RHEINHEIMER *et al.*, 2017). Além disso, em pacientes com a doença de Alzheimer, o genótipo GG foi associado com um risco aumentado em pacientes que também portavam o alelo  $\epsilon 4$  da ApoE (TAN *et al.*, 2013). Contudo, apesar do componente inflamatório associado aos transtornos psiquiátricos, no presente trabalho, o genótipo GG do SNP no gene *NLRP3* (rs10754558, C/G) não foi associado com risco aumentado para o TDM.

Apesar da falta de uma associação direta do genótipo GG com a prevalência do TDM, em uma subamostra de indivíduos, a funcionalidade do SNP foi avaliada através da dosagem dos níveis periféricos de IL-1 $\beta$ . Nessa população, os níveis de IL-1 $\beta$  não foram diferentes entre indivíduos diagnosticados com TDM e controles. De fato, os dados epidemiológicos são bastante heterogêneos, e enquanto alguns estudos mostram níveis aumentados de IL-1 $\beta$  na circulação periférica e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com TDM (GOLDSMITH *et al.*, 2016; DOWLATI *et al.*, 2010; KAESTNER *et al.*, 2005; LEVINE *et al.*, 1999), outros não identificaram alterações significativas (SYED *et al.*, 2018; KÖHLER *et al.*, 2017). Corroborando nosso resultado, SYED e colaboradores (2018) demonstraram que os níveis de IL-1 $\beta$  não estão alterados em um grupo de pacientes com TDM comparado aos controles saudáveis. Contudo, estes níveis parecem prever a resposta à terapia farmacológica ou psicoterapia, e enquanto pacientes que responderam ao tratamento não tiveram alterações significativas nos níveis de IL-1 $\beta$ , pacientes não responsivos tiveram um aumento na IL-1 $\beta$  (SYED *et al.*, 2018). Estes resultados reforçam a ideia de que a medida dos níveis periféricos de citocinas por si só é muito heterogênea e que as respostas a estas citocinas em pacientes com TDM e controles pode fornecer maiores informações sobre as alterações imunes associadas ao TDM.

Diversos fatores podem contribuir para a heterogeneidade observada nos estudos que avaliam níveis de citocinas e TDM, incluindo diferenças na severidade da doença, nos sintomas e comorbidades, além de outras características da população, incluindo a presença de polimorfismos genéticos específicos. No presente estudo, independente do diagnóstico, os níveis séricos de IL-1 $\beta$  são mais elevados nos indivíduos portadores do genótipo GG quando comparados aos

indivíduos portadores do alelo C (GC e CC). Este é o primeiro estudo com uma abordagem clínica que demonstra que o alelo G, associado à maior estabilidade do RNAm em ensaios *in vitro* anteriores, está de fato associado com níveis proteicos aumentados de IL-1 $\beta$ . Especula-se que a presença do alelo G na região 3'UTR pode desfazer um sítio de ligação primário influenciando o recrutamento e a ligação do microRNA-223 ao genoma, o qual foi anteriormente demonstrado ser capaz de diminuir a transcrição do gene *NLRP3* (BAUERNFEIND *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2016). Assim, esta perturbação parece aumentar a estabilidade do RNAm do inflamassoma NLRP3 em células THP-1, quando comparado com os constructos contendo o alelo C (HITOMI *et al.*, 2009). Estes resultados de um possível ganho de função foram reforçados em um estudo que demonstra um aumento na expressão do RNAm do inflamassoma NLRP3 em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos que portavam um ou dois alelos G quando comparados a indivíduos portadores do genótipo CC (ZHU *et al.*, 2016). Entretanto, no presente trabalho, os níveis de IL-1 $\beta$  não foram maiores nos indivíduos heterozigotos (GC) como observado por ZHU e colaboradores (2016) para a transcrição do NLRP3, sugerindo que o efeito funcional desse polimorfismo ainda precisa ser melhor investigado.

No presente estudo, indivíduos com diagnóstico de TDM e portadores do genótipo GG apresentaram níveis mais altos de IL-1 $\beta$ , mesmo quando comparados aos indivíduos GG controles (ou aos indivíduos que apresentaram os genótipos CC ou GC). Esses resultados sugerem que em indivíduos com diagnóstico de TDM, a presença do genótipo GG caracteriza um fenótipo inflamatório e possivelmente uma disfunção na via do inflamassoma NLRP3. A identificação de indivíduos que poderiam se beneficiar de uma estratégia anti-inflamatória para tratar TDM já foi reforçada previamente (RAISON *et al.*, 2017). RAISON e colaboradores (2013) demonstraram em pacientes com TDM e altos níveis de proteína C reativa (caracterizando inflamação periférica), que uma remissão significativa dos sintomas foi observada após o uso de infliximab, um inibidor de TNF- $\alpha$ . Por outro lado, em pacientes com baixos níveis basais de proteína C reativa, sugerindo ausência de inflamação periférica, o tratamento com infliximab não foi eficiente e ainda piorou alguns dos sintomas, sugerindo que nem todos os pacientes podem se beneficiar de estratégias anti-inflamatórias para melhorar os sintomas relacionados ao humor (RAISON *et al.* 2013, RAISON, 2017).

Com relação ao potencial da via do inflamassoma NLRP3, no estudo de ALCOCER-GOMEZ e colaboradores (2017), um aumento na expressão das proteínas da via do inflamassoma NLRP3 foi observado nas células mononucleares de pacientes com episódio de TDM não tratados. Estes níveis já não se encontravam aumentados em pacientes com TDM após tratamento crônico (mínimo de seis meses) com antidepressivos de várias classes, incluindo fluoxetina, paroxetina, mianserina, mirtazapina, venlafaxina, desvenlafaxina, amitriptilina, imipramina e agomelatina. Apesar de ser um estudo transversal comparando pacientes não tratados e tratados, os resultados sugerem a via do inflamassoma NLRP3 como um biomarcador de resposta aos antidepressivos. Esses resultados são fortalecidos pelo estudo de SYED e colaboradores (2018), onde o tratamento por 12 semanas com escitalopram, duloxetine ou terapia cognitivo-comportamental demonstraram estabilizar o aumento de IL-1 $\beta$  apenas em pacientes que responderam ao tratamento, enquanto naqueles que não responderam ao tratamento os níveis de IL-1 $\beta$  continuaram aumentando, sugerindo que apesar de não apresentarem diferenças basais, a falta de resposta ao tratamento tanto farmacológico quanto psicoterápico está associada a uma disfunção na via do inflamassoma NLRP3 (SYED *et al.*, 2018). Dados não publicados do nosso grupo também sugerem que a presença do genótipo GG do SNP (rs10754558, C/G) no gene *NLRP3* está associada a pior resposta à psicoterapia para o TDM e ansiedade.

Assim, tendo em vista a importância do polimorfismo avaliado para a manutenção dos níveis de IL-1 $\beta$ , e a associação entre TDM, genótipo GG e níveis de IL-1 $\beta$ , nossos resultados sugerem que a presença deste polimorfismo pode explicar pelo menos parte da heterogeneidade e ausência de resposta aos tratamentos observadas na literatura. Desta maneira, as diferenças genéticas observadas em nosso estudo podem ajudar a identificar e escolher melhores estratégias de tratamento para subgrupos de pacientes com sintomas depressivos associados à hiperativação de respostas imunes, uma hipótese que atualmente está ganhando maior atenção na literatura (SYED *et al.*, 2018; RAISON, 2017; RAISON *et al.*, 2013). Apesar do potencial desses resultados, os mesmos devem ser considerados frente à alguns fatores limitantes. Primeiramente a IL-1 $\beta$  foi avaliada em uma subamostra de indivíduos. Além disso, uma avaliação longitudinal ajudaria a entender melhor o impacto desse polimorfismo nos níveis de IL-1 $\beta$  e a suscetibilidade ao TDM após estímulos estressantes e, considerando a heterogeneidade do TDM, nossos dados devem ser vistos com cautela até serem replicados independentemente. Entretanto,

esse estudo tem a força metodológica de usar uma amostra populacional bem balanceada de indivíduos jovens com baixo uso de medicamentos psiquiátricos, limitando possíveis fatores de confusão. A observação de que os pacientes com o TDM e portadores do genótipo GG apresentam maiores níveis de IL-1 $\beta$  demonstra o envolvimento do inflamassoma NLRP3 e da IL-1 $\beta$  no TDM. A presença de inflamação em pacientes com TDM é heterogênea e a identificação de potenciais marcadores genéticos capazes de controlar as respostas inflamatórias pode ser útil não apenas como um biomarcador diferencial para caracterizar a heterogeneidade no diagnóstico do TDM, mas também como um potencial alvo para a intervenção farmacológica para grupos específicos de pacientes proporcionando melhor resposta terapêutica.

## **CAPÍTULO II: ENVOLVIMENTO DO IMUNORRECEPTOR CD300F NO TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR**

### **1. Estudo em roedores: A deleção genética do imunorreceptor CD300f induz alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao Transtorno Depressivo Maior**

As alterações neurobiológicas no TDM são diversas e envolvem muitos sistemas biológicos, levando a distúrbios endócrinos, desregulação da neurotransmissão e disfunção do sistema imunológico (OTTE *et al.*, 2016). A ideia de uma disfunção imunológica na fisiopatologia do TDM emergiu em 1991, quando Smith introduziu a Teoria Macrofágica da Depressão (SMITH, 1991). Essas ideias iniciais foram ainda reforçadas por vários estudos subsequentes, mostrando que pacientes com TDM apresentam um perfil imune alterado com aumento de monócitos circulantes e citocinas inflamatórias (CHEN *et al.*, 2017; WOHLER *et al.*, 2014; DOWLATI *et al.*, 2010). De fato, estudos clínicos e pré-clínicos têm elucidado muitos mecanismos inflamatórios diferentes presentes no TDM com uma comunicação bidirecional entre o SNC e o sistema imunológico periférico (KAUFMANN *et al.*, 2017; LOUVEAU *et al.*, 2015; IWATA *et al.*, 2013).

A família de imunorreceptores CD300 compreende receptores transmembranares estimulatórios e inibitórios, presentes em células imunológicas (CLARK *et al.*, 2001). A família de receptores ortólogos CD300 em roedores tem uma variedade de nomes incluindo moléculas semelhantes a CMRF (CLM) (CHUNG *et al.*, 2003), mas para simplificar, neste trabalho usaremos a nomenclatura humana para ambas as espécies. Entre os receptores da família CD300, o imunorreceptor CD300f (ou CLM-1, em roedores) está presente em monócitos, neutrófilos, células natural killer e mastócitos (CLARK *et al.*, 2009). Foi demonstrado que a ativação de receptores CD300f por ceramida ou fosfatidilcolina induz o recrutamento de proteínas tirosina fosfatases, como as fosfatases SHP-1 e SHP-2, além da proteína quinase PI3K (IZAWA *et al.*, 2014; IZAWA *et al.*, 2012), o que leva à inibição dos receptores de reconhecimento de padrões TLR-4 e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, inibindo ainda mais o processo inflamatório (SHIBA *et al.*, 2017; MATSUKAWA *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2011;). No entanto, as vias de sinalização e o potencial papel protetor dos imunorreceptores CD300f, especialmente no SNC, não foram completamente elucidados até o momento.

No SNC, os imunorreceptores CD300f estão majoritariamente expressos na microglia, e parecem ter um papel neuroprotetor (PELUFFO *et al.*, 2012). PELUFFO e colaboradores (2012) demonstraram que a super-expressão do imunorreceptor CD300f diminui o volume da área lesionada após uma administração estriatal de NMDA (PELUFFO *et al.*, 2012). Além disso, um aumento na expressão do RNAm e da proteína dos imunorreceptores CD300f é observado no nervo ciático de camundongos após lesão, sugerindo que este imunorreceptor pode estar envolvido na regulação e controle de processos de regeneração via regulação da migração e polarização de macrófagos (PELUFFO *et al.*, 2015). Em um estudo recente usando co-culturas de neurônios e astrócitos hipocâmpais, também foi demonstrado que a ativação dos imunorreceptores CD300f estava envolvida na proteção celular contra o peptídeo A $\beta$ , sugerindo um possível papel protetor para o CD300f na doença de Alzheimer (LIMA *et al.*, 2017). Além disso, uma diminuição na expressão de CD300f foi encontrado em monócitos de pacientes com esclerose múltipla (MARTÍNEZ-BARRIOCANAL *et al.*, 2017).

Apesar das evidências iniciais que apontam para um papel protetor do imunorreceptor CD300f em doenças relacionadas à neurodegeneração e inflamação, o envolvimento destes receptores em doenças psiquiátricas ainda precisa ser explorado. Como a inflamação crônica de baixo grau e a neurodegeneração têm sido frequentemente associadas e consideradas componentes importantes da fisiopatologia do TDM, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel do imunorreceptor CD300f no TDM.

## **1. Métodos**

### **1.1. Animais**

Camundongos C57BL/6J machos e fêmeas selvagens (WT) e camundongos com deleção genética dos imunorreceptores CD300f (CD300f<sup>-/-</sup>), adultos com 5 meses de idade ou idosos com 18 meses de idade, foram obtidos do biotério do Instituto Pasteur de Montevidéu, Uruguai. Os camundongos CD300f<sup>-/-</sup> foram gerados de acordo com XI e colaboradores (2010) utilizando como base os camundongos selvagens C57BL/6J (XI *et al.*, 2010). Os animais foram mantidos em ambiente controlado (23  $\pm$  2°C, 12h-ciclo claro/escuro, com acesso livre à ração e água) e tratados de acordo com as diretrizes da Federação Experimental Uruguaia após a aprovação pelo Comitê de Ética do Instituto Pasteur de Montevidéu (Protocolo número: 014-16).

## **1.2. Análises comportamentais**

Os animais WT e CD300f-/- foram submetidos a diversas análises comportamentais. Primeiramente, os animais foram habituados à sala de realização dos testes comportamentais 24 h antes do início dos experimentos, onde foram mantidos sob as mesmas condições do biotério. Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro em uma sala livre de ruídos e sob pouca luminosidade condicionada por uma lâmpada de luz vermelha, a qual era acionada aproximadamente 1h antes do teste para habituação dos animais. Todos os comportamentos foram filmados utilizando o software AnyMaze para serem analisados posteriormente. As fêmeas com 5 meses de idade passaram pelos testes comportamentais na seguinte ordem: um grupo foi submetido ao teste do campo aberto seguido pelo teste de suspensão pela cauda, outro grupo foi submetido ao teste do campo aberto seguido pelo teste do nado forçado e um terceiro grupo foi submetido ao teste de borrifagem de sacarose seguido pelo teste de esconder esferas. As fêmeas com 18 meses de idade passaram pelos testes comportamentais na seguinte ordem: teste do campo aberto, seguido pelo teste de suspensão pela cauda e pelo teste de borrifagem de sacarose. Os machos de 5 meses idade passaram pelos testes comportamentais na seguinte ordem: teste do campo aberto seguido pelo teste de suspensão pela cauda e pelo teste de borrifagem de sacarose. Todos os testes foram replicados pelo menos duas vezes em grupos de animais diferentes.

### **1.2.1. Teste do campo aberto**

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar a atividade locomotora e a capacidade de habituação dos animais. O aparato consistia em uma caixa branca de acrílico medindo (40 cm x 60 cm x 50 cm de altura). Os animais foram expostos durante 6 minutos à arena e a distância total percorrida foi registrada e avaliada pelo software AnyMaze. A avaliação da reexposição ao campo aberto está relacionada à forma mais elementar de aprendizagem não-associativa dependente do hipocampo (LEUSSIS & BOLIVAR, 2006; POPOVIÊ, CABALLERO-BLEDA & POPOVIĆ, 2014). Este parâmetro foi avaliado pela distância percorrida (em metros) no campo aberto no dia 1 (locomoção) e no dia 3, 48 horas após a primeira exposição (habituação). Uma diminuição na distância percorrida na arena na segunda exposição ao aparato é considerada um comportamento de habituação ao ambiente. Além disso, o tempo de permanência bem como o número de entradas no centro do campo aberto foram analisados como indicativo de comportamento



ansioso, sendo que o maior tempo gasto no centro da arena, bem como maior número de entradas no centro da arena é considerado um comportamento ansiolítico. A arena foi limpa com 10% de etanol entre os animais, para excluir possíveis pistas olfativas.

### **1.2.2. Teste de suspensão pela cauda**

Os camundongos foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda, que consiste em uma situação inescapável e moderadamente estressante, onde os animais são suspensos pela cauda e o tempo de imobilidade é avaliado. Neste teste preditivo e de desespero comportamental, o aumento do tempo de imobilidade gerado pela redução das tentativas de escapar da situação aversiva é considerado um comportamento depressivo (STERU *et al.*, 1985). Para realizar o teste de suspensão pela cauda, os camundongos foram suspensos pela cauda acima do chão, presos aproximadamente 1 cm pela ponta da cauda por uma fita adesiva e o tempo de imobilidade (em segundos) foi registrado e avaliado durante 6 minutos. Neste teste é esperado que os animais submetidos à modelos de depressão tenham um aumento no tempo de imobilidade, enquanto que o tratamento com antidepressivos seja capaz de diminuir esse tempo.

### **1.2.3. Teste do nado forçado**

O teste do nado forçado é um modelo de desespero comportamental similar ao teste de suspensão pela cauda, geralmente usado como modelo preditivo na avaliação do potencial antidepressivo ou depressor de compostos ou manipulações (CRYAN, MARKOU, LUCKI *et al.*, 2002). Neste teste, cada camundongo foi individualmente forçado a nadar em um recipiente cilíndrico aberto (10 cm de diâmetro x 25 cm de altura) contendo aproximadamente 19 cm de profundidade de água à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e o tempo de imobilidade foi registrado durante 6 minutos (PORSOLT, BERTIN & JALFRE, 1977). A mobilidade é definida quando os animais executam movimentos vigorosos para sair da situação estressante aguda. Não foi considerado mobilidade os pequenos movimentos executados pelos animais apenas para manter o equilíbrio ou manter a cabeça acima da água (CAN *et al.*, 2012). Neste teste também se espera que os animais submetidos à modelos de depressão tenham um aumento no tempo de imobilidade, enquanto que o tratamento com antidepressivos seja capaz de diminuir esse tempo.

#### **1.2.4. Teste de borrifagem de sacarose**

Neste teste, uma solução de sacarose a 10% foi espalhada no dorso dos animais. Esta solução viscosa suja o animal e ele inicia o comportamento de auto-limpeza. Após a aplicação da solução de sacarose, os animais foram colocados individualmente em recipientes de vidro e seu comportamento foi gravado durante 5 minutos. A latência para iniciar o comportamento de auto-limpeza e o tempo total de auto-limpeza foram os parâmetros associados ao comportamento motivacional e ao comportamento anedônico e de autocuidado, respectivamente (ROSA *et al.*, 2013; MALATYNSKA *et al.*, 2012). O recipiente foi limpo com etanol a 10% entre os animais para excluir possíveis pistas olfativas. Neste teste é esperado que os animais submetidos à modelos de depressão tenham um aumento na latência para iniciar o comportamento de auto-limpeza indicando uma motivação reduzida e que apresentem uma diminuição no tempo total de autolimpeza indicando um comportamento anedônico. Além disso, se espera que o tratamento com antidepressivos seja capaz de reverter esses parâmetros.

#### **1.2.5. Teste de esconder esferas**

O teste de esconder esferas é utilizado para avaliação do comportamento ansiogênico e potencialmente obsessivo-compulsivo (ALBELDA e JOEL, 2012). Esse teste foi realizado segundo DEACON (2006) com pequenas modificações. Uma caixa de residência individual foi preenchida com 5 cm de maravalha, em cima da qual 12 esferas de vidro foram distribuídas, aproximadamente a 4 cm uma da outra. Cada camundongo foi colocado individualmente no mesmo canto da caixa de residência para explorá-la. Após 30 minutos, foi contado o número de esferas totalmente enterradas ou parcialmente enterradas (2/3 ou mais). As esferas de vidro foram limpas com etanol a 10% entre o teste de diferentes animais e a maravalha foi reutilizada entre os animais da mesma caixa (DEACON, 2006). Neste teste, um aumento no número de esferas escondidas é considerado um comportamento ansioso e compulsivo, o qual é revertido pelo tratamento com ansiolíticos.

### **1.3. Administração de lipopolissacarídeo**

Os animais WT e CD300f<sup>-/-</sup> fêmeas com 5 meses de idade receberam uma injeção única intraperitoneal de 2 mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS, *Escherichia coli*, Serotype 026:B6; Sigma-Aldrich; MO; USA) ou veículo (tampão fosfato salino, PBS 1X). Após a administração, os animais foram colocados em suas caixas de residência

e 24 h após foram avaliados no teste de borrifagem de sacarose como descrito anteriormente no item 1.2.4.

#### **1.4. Tratamento farmacológico com bupropiona**

Os animais WT e CD300f<sup>-/-</sup> fêmeas com 5 meses de idade, receberam uma única injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de bupropiona (Sigma Chemical co. St. Louis, U.S.A.) ou veículo (tampão fosfato salino, PBS 1X). Após a administração, os animais foram colocados em suas caixas de residência e 30 minutos após foram avaliados no teste de borrifagem de sacarose como descrito anteriormente no item 1.2.4.

#### **1.5. Análises moleculares e bioquímicas**

Logo após os testes comportamentais os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 100 mg/kg e perfundidos com tampão fosfato salina (PBS) gelado para a eliminação completa do sangue. Os animais foram decapitados e os hemisférios cerebrais (sem o cerebelo) foram dissecados e em outro grupo de animais o hipocampo foi dissecado. As estruturas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até as análises moleculares e bioquímicas.

##### **1.5.1. Expressão gênica por qPCR**

As amostras de tecidos dos hemisférios cerebrais totais foram lisadas e homogeneizadas em Trizol (Sigma, Cat. N° SIGMA T9424), e posteriormente purificados usando Nucleospin RNA II Kit livre de RNase e DNase (Macherey Nagel Cat. N° 740955.50). Para síntese de cDNA, as amostras de RNA foram reversamente transcritas usando o protocolo de transcriptase reversa MMLV segundo o fabricante (Invitrogen 28025-013). O qPCR foi realizado usando reagentes da TaqMan (Invitrogen/Applied Biosystems): TaqMan Fast Advanced Master Mix (1205919) e sondas específicas para os seguintes genes: *NLRP3*, *IL1 $\beta$* , *IL18*, *IL6*, *IL1RN*, *IL10* e *GADPH*. A razão da expressão relativa dos genes foi calculada usando *GADPH* como gene de controle interno, conforme descrito anteriormente (PFAFFL, 2001). As condições dos ciclos foram de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min seguido de 45 ciclos de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 s e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min (PELUFFO *et al.*, 2015). A quantidade total de cDNA foi calculada com base nos valores do ciclo (CT) usando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001)

### 1.5.2. ELISA

As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (50 mM TRIS, 1% NP40, 0,25% Na-deoxicolato, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4 + coquetel de inibidor de proteases) sonicadas e centrifugadas (13.000 g, 4°C por 30 minutos) e o sobrenadante foi coletado. Os níveis hipocampais 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 selada 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, pH 7,4) e posteriormente foi bloqueada 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 avidina-horseradish (100  $\mu$ l por poço) por 30 minutos. Após este período a placa foi lavada com tampão de lavagem por 5 vezes e adicionou-se 100  $\mu$ l de TMB solution 1x por poço, o qual ficou incubando por 15 minutos. Ao final, a reação foi parada utilizando 50  $\mu$ l por poço de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a placa foi lida em um espectrofotômetro à 450 nm. O coeficiente de variação intra-ensaio (C.V.) foi inferior a 5% e o ensaio inter-ensaio C.V. foi inferior a 10%. Os valores foram expressos em pg/mL.

### 1.5.3. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Os níveis hipocampais de noradrenalina, dopamina e serotonina foram mensurados por HPLC. As amostras foram pesadas, sonicadas em ácido perclórico (0,1 M) e centrifugadas (15.000 g) por 15 minutos. O sobrenadante foi injetado no sistema de HPLC (PM-80 BAS, West Lafayette, IN, USA) equipado com uma coluna C18 (Luna, partículas 5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4,6 mm; Phenomenex) e com um detector eletroquímico (LC-4C BAS) com um potencial de oxidação configurado em +0.70 V. A fase móvel foi composta de ácido cítrico (0,15 M), sulfato de sódio octilo (0,6 mM), 4% de acetonitrilo e 1,6% de tetrahydrofurano com pH

3,0 e uma taxa de corrente de 1,0 ml/min. Os resultados foram expressos em ng/g de tecido.

### **1.6. Análises estatísticas**

Os resultados foram avaliados quanto à dispersão e normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. As diferenças comportamentais, bioquímicas e moleculares entre os animais CD300f<sup>-/-</sup> e selvagens (WT) foram determinadas utilizando o teste t de student. Para avaliar a habituação dos animais ao teste do campo aberto foi utilizada a ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni. Os experimentos para avaliar o efeito do tratamento com LPS e o efeito do tratamento com bupropiona no teste de borrifagem de sacarose foram analisados pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni, quando apropriado. Valores extremos foram identificados pelo teste de Grubbs e foram posteriormente excluídos das análises. Os dados estão representados como média±E.P.M e  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

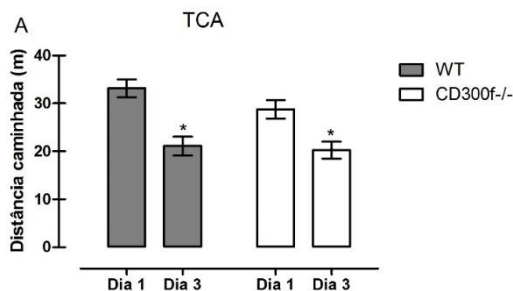
## **2. Resultados**

### **2.1. Alterações comportamentais em fêmeas de cinco meses de idade**

#### **2.1.1. Locomoção e habituação ao ambiente**

A Figura 1 demonstra a locomoção espontânea e a capacidade de habituação dos animais no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revela que há uma redução significativa na locomoção na segunda exposição ao teste do campo aberto [ $F(1,22)=83,23$ ,  $p < 0,0001$ ], demonstrando que tanto os camundongos fêmeas selvagens quanto os CD300f<sup>-/-</sup> apresentaram habituação ao teste. Contudo, não foi observado um efeito do genótipo [ $F(1,22)=1,22$ ,  $p=0,281$ ] e não há interação entre as variáveis de tempo e genótipo [ $F(1,22)=2,46$ ,  $p=0,130$ ].

**Figura 1. Efeito da depleção genética dos receptores CD300f na locomoção espontânea e habituação**

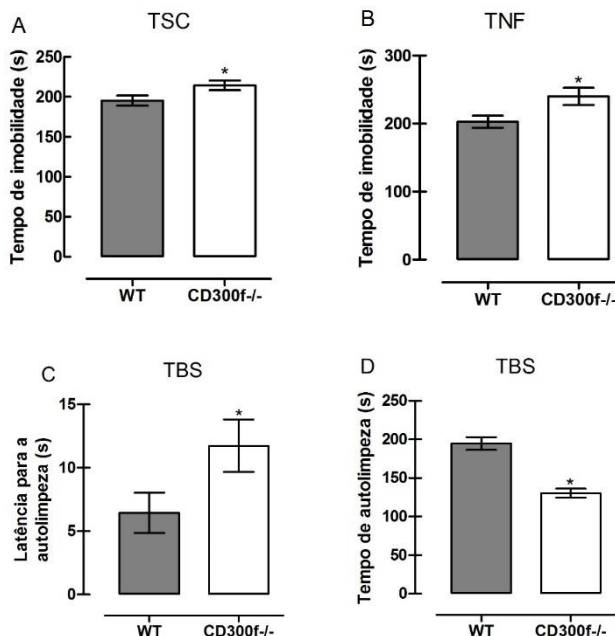


**Legenda:** A distância total percorrida (metros) no teste do campo aberto foi avaliada como um indicativo da atividade ambulatoria espontânea nos dias 1 (locomoção) e 3 (habituação) em animais selvagens (WT, n=24) e CD300f-/- (n=24). Os dados estão representados como média±E.P.M. As diferenças foram analisadas por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  comparado ao CD300f-/- dia 1 e \*  $p < 0,05$  comparado ao WT dia 1. TCA: Teste do campo aberto; WT: Animais selvagens; CD300f-/-: Animais nocaute para o gene CD300f.

### 2.1.2. Comportamento depressivo, motivacional e anedônico

Para avaliar o comportamento depressivo dos animais CD300f-/- o teste de suspensão pela cauda e o teste do nado forçado foram realizados. Na Figura 2 podemos observar que os animais CD300f-/- apresentaram maior tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda ( $t(20)=2,156$ ,  $p=0,043$ , Figura 2A) e no teste do nado forçado ( $t(15)=2,418$ ,  $p=0,028$ , Figura 2B) quando comparados aos animais selvagens, indicando um fenótipo depressivo nos animais sem a presença do imunorreceptor CD300f. Além disso, a resposta hedônica dos animais CD300f-/- foi avaliada através do teste de borrifagem de sacarose. Como apresentado na Figura 2C os animais CD300f-/- apresentaram um aumento na latência para começar o comportamento de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose quando comparados aos animais selvagens, uma evidência de baixo estado motivacional e menor comportamento de auto-cuidado ( $t(29)=2,039$ ,  $p=0,051$ ). Além disso, os resultados na Figura 2D revelam que os animais CD300f-/- apresentaram menor interesse na solução de sacarose quando comparados aos animais selvagens, um indicativo de comportamento anedônico ( $t(30)=6,380$ ,  $p < 0,0001$ ).

**Figura 2. Comportamento depressivo, motivacional e anedônico em fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> de cinco meses de idade**



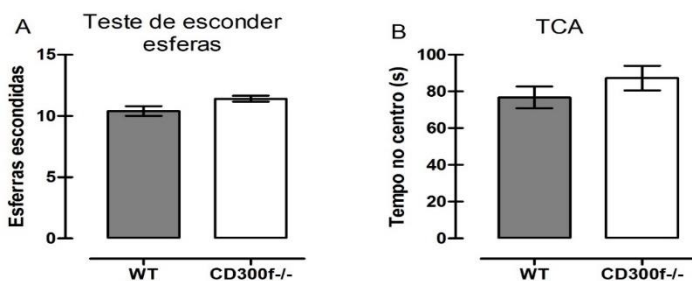
**Legenda:** O tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (WT, n=11; CD300f<sup>-/-</sup>, n=11), apresentado em A e no teste do nado forçado (WT, n=11; CD300f<sup>-/-</sup>, n=6) apresentado em B foi mensurado (segundos) para avaliar comportamentos associados à depressão. A latência para começar o comportamento de autolimpeza (segundos) no teste da borrifagem de sacarose (WT, n=16; CD300f<sup>-/-</sup>, n=16) foi analisada para avaliar o comportamento motivacional e de auto-cuidado (C) e o tempo total de autolimpeza (WT, n=16; CD300f<sup>-/-</sup>, n=15) foi analisado para avaliar a resposta a uma solução palatável de sacarose (D). Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo selvagem. *TSC*: Teste da suspensão pela cauda; *TNF*: Teste do nado forçado; *TBS*: Teste da borrifagem de sacarose; *WT*: Animais selvagens; *CD300f<sup>-/-</sup>*: Animais nocaute para o gene *CD300f*.

### 2.1.3. Comportamentos relacionados à ansiedade

A Figura 3 A demonstra os resultados obtidos no teste de esconder esferas e no teste do campo aberto com o intuito de avaliar comportamentos relacionados à compulsão e ansiedade. Foi encontrada apenas uma tendência para uma diferença significativa entre os animais CD300f<sup>-/-</sup> e os animais selvagens no teste de esconder esferas

( $t(8)=2,132$ ,  $p=0,065$ ). Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os animais selvagens e CD300f<sup>-/-</sup> com relação ao tempo em segundos permanecido no centro da arena do teste do campo aberto, analisado como uma medida de ansiedade ( $t(22)=1,177$ ,  $p=0,252$ ). Outros parâmetros como distância percorrida no centro do teste do campo aberto e número de entradas no centro também foram avaliados (dados não mostrados) e confirmaram a ausência de comportamento ansioso ou compulsivo nos animais CD300f<sup>-/-</sup>.

**Figura 3. Avaliação dos comportamentos associados à ansiedade em fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> de cinco meses de idade**



**Legenda:** No teste de esconder esferas (WT, n=5; CD300f<sup>-/-</sup>, n=5), o número total de esferas escondidas foi contado como um indicativo de comportamento compulsivo e ansioso (A). O tempo permanecido no centro do teste do campo aberto (WT, n=12; CD300f<sup>-/-</sup>, n=12) foi mensurado (segundos) para avaliar o comportamento de ansiedade, sendo o maior tempo de permanência no centro considerado um comportamento ansiolítico (B). Os dados estão representados como média±E.P.M. TCA: Teste do campo aberto; WT: Animais selvagens; CD300f<sup>-/-</sup>: Animais nocaute para o receptor CD300f.

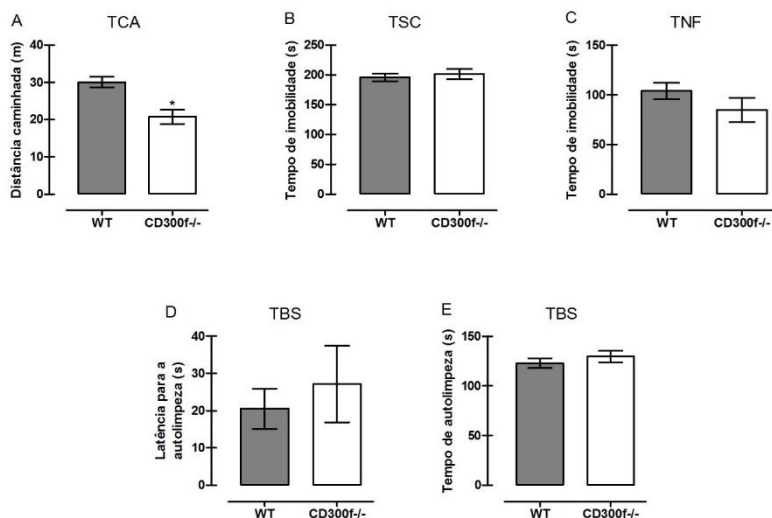
## 2.2. Alterações comportamentais em machos adultos de cinco meses de idade

A Figura 4A mostra que os camundongos machos CD300f<sup>-/-</sup> com 5 meses de idade apresentam maior atividade locomotora no teste do campo aberto quando comparados aos animais selvagens ( $T(19)=3,898$ ,  $p=0,001$ ). Contudo, os camundongos machos CD300f<sup>-/-</sup> não apresentaram diferenças no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda ( $t(19)=0,549$ ,  $p=0,588$ , Figura 4B) e no teste do nado forçado ( $t(7)=1,234$ ,  $p=0,257$ , Figura 4C) quando comparados aos respectivos animais selvagens. Além disso, quando avaliados no teste de borrifagem de sacarose os machos CD300f<sup>-/-</sup> não diferem na latência para começar o comportamento de autolimpeza ( $t(10)=0,573$ ,  $p=0,579$ , Figura 4D) ou



no tempo total de autolimpeza ( $t(10)=0,907$ ,  $p=0,385$ , Figura 4E) quando comparados aos animais selvagens. Esses resultados indicam que a ausência do imunorreceptor CD300f leva a disfunções comportamentais relacionadas à depressão e anedonia, apenas nas fêmeas. Sendo assim, todas as análises bioquímicas feitas a partir daqui foram realizadas apenas em fêmeas com 5 meses de idade.

**Figura 4. Alterações comportamentais em machos de cinco meses de idade**

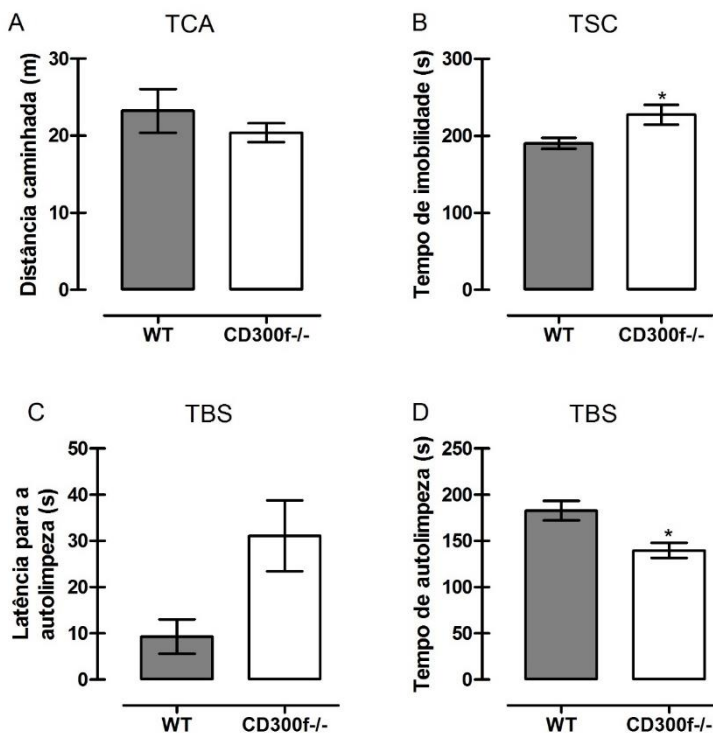


**Legenda:** A distância total caminhada (metros) no teste do campo aberto (WT,  $n=11$ ; CD300f-/-,  $n=10$ ) foi avaliada como um indicativo da atividade ambulatoria espontânea dos animais (A). O tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (WT,  $n=11$ ; CD300f-/-,  $n=10$ ) demonstrado em B e no teste do nado forçado (WT,  $n=4$ ; CD300f-/-,  $n=5$ ) em C, foi mensurado (segundos) para avaliar o comportamento depressivo. A latência (segundos) para começar o comportamento de autolimpeza (WT,  $n=6$ ; CD300f-/-,  $n=6$ ) exibido em D e o tempo total (segundos) de autolimpeza (WT,  $n=6$ ; CD300f-/-,  $n=6$ ) exibido em E no teste de borrifagem de sacarose foi mensurado para avaliar o comportamento motivacional e de auto-cuidado e o comportamento hedônico, respectivamente. Os dados estão representados como média $\pm$ E.P.M. \* representa  $p<0,05$  comparado ao grupo WT. TCA: Teste do campo aberto; TSC: Teste de suspensão pela cauda; TNF: Teste do nado forçado; TBS: Teste de borrifagem de sacarose; WT: Animais selvagens; CD300f-/-: Animais nocaute para o gene CD300f.

### **2.3. Comportamentos associados à depressão e anedonia em fêmeas de dezoito meses de idade**

Para avaliar se os comportamentos associados à depressão e anedonia observados em fêmeas adultas de 5 meses persistiam ao longo do tempo, uma coorte de fêmeas com 18 meses foi submetida aos mesmos testes comportamentais. A Figura 5A mostra que não há diferenças na locomoção espontânea no teste do campo aberto entre os animais selvagens e CD300f<sup>-/-</sup> com 18 meses de idade ( $t(19)=1,086$ ,  $p=0,291$ ). Também podemos observar que os animais CD300f<sup>-/-</sup> com 18 meses de idade apresentam maior tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda ( $t(18)=2,033$ ,  $p=0,057$ , Figura 5B). Além disso, os animais CD300f<sup>-/-</sup> demonstraram uma tendência a apresentar maior tempo de latência para iniciar o comportamento de autolimpeza ( $t(18)=1,085$ ,  $p=0,087$ , Figura 5C) e menor tempo total de autolimpeza ( $t(18)=3,002$ ,  $p=0,007$ , Figura 5D) no teste de borrifagem de sacarose quando comparados aos animais selvagens com 18 meses de idade, indicando que o fenótipo depressivo e anedônico nos animais sem a presença do imunorreceptor CD300f persiste ao longo da vida.

**Figura 5. Comportamento associado à depressão, anedonia e locomoção em fêmeas com 18 meses de idade**



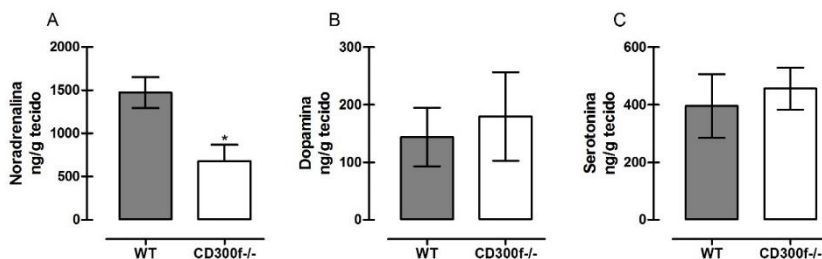
**Legenda:** A distância total percorrida (metros) no teste do campo aberto (WT, n=7; CD300f<sup>-/-</sup>, n=14) foi avaliada como um indicativo da atividade ambulatoria espontânea dos animais (A). O tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (WT, n=7; CD300f<sup>-/-</sup>, n=13) exibido em B foi mensurado (segundos) para avaliar o comportamento depressivo. A latência (segundos) para começar o comportamento de autolimpeza (WT, n=6; CD300f<sup>-/-</sup>, n=14) apresentada em C e o tempo total (segundos) de autolimpeza (WT, n=6; CD300f<sup>-/-</sup>, n=14) apresentado em D no teste de borrifagem de sacarose foi mensurado para avaliar o comportamento motivacional e hedônico, respectivamente. Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo WT. *TCA*: Teste do campo aberto; *TSC*: Teste de suspensão pela cauda; *TBS*: Teste de borrifagem de sacarose; *WT*: Animais selvagens; *CD300f<sup>-/-</sup>*: Animais nocaute para o gene *CD300f*.

## 2.4. Alterações neuroquímicas nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup>

### 2.4.1. Níveis hipocampais de monoaminas

A fim de investigar quais alterações neuroquímicas poderiam estar associadas aos comportamentos observados, os níveis hipocampais dos neurotransmissores monoaminérgicos foram avaliados e estão apresentados na Figura 6. Para isso, foram utilizadas as fêmeas de 5 meses em todas as avaliações subsequentes. Observou-se uma diminuição significativa nos níveis hipocampais de noradrenalina nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> com 5 meses de idade quando comparadas aos respectivos animais selvagens ( $t(6)=3,037$ ,  $p=0,020$ , Figura 6A). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nos níveis hipocampais de dopamina ( $t(6)=0,385$ ,  $p=0,713$ , Figura 6B) ou serotonina ( $t(4)=0,455$ ,  $p=0,672$ , Figura 6C). Os resultados demonstram que as fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> possuem alterações hipocampais nos níveis de noradrenalina que podem estar associadas ao comportamento depressivo e anedônico observado.

**Figura 6.** Alterações nos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos no hipocampo das fêmeas CD300f<sup>-/-</sup>

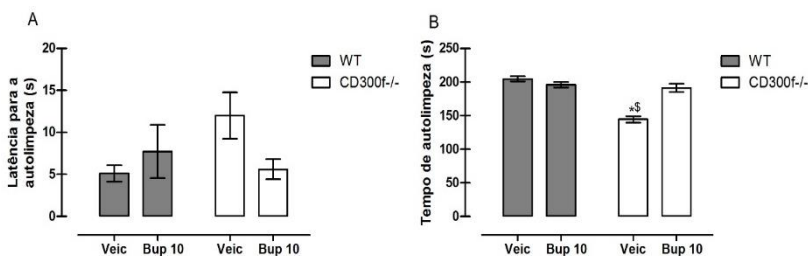


**Legenda:** A concentração de noradrenalina (A), dopamina (B) e serotonina (C) foi avaliada no hipocampo das fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> (n=4) e WT (n=4) com 5 meses de idade. Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa  $p<0,05$  comparado ao grupo WT. WT: Animais selvagens; CD300f<sup>-/-</sup>: Animais nocaute para o gene CD300f.

Para se estabelecer uma relação causal entre as alterações comportamentais e neuroquímicas observadas, as fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> e selvagens com 5 meses de idade foram tratadas com bupropiona (10 mg/kg i.p.), um antidepressivo inibidor da recaptação de dopamina e de noradrenalina, ou veículo (PBS 1x i.p.) e submetidas ao teste de borrifagem de sacarose após 30 minutos. Com relação ao tempo de latência para começar o comportamento de auto-limpeza

(comportamento motivacional), a ANOVA de duas vias revelou que há uma interação significativa entre o genótipo e o tratamento [ $F(1,27)=4,283$ ,  $p=0,048$ ], mas não existe efeito do genótipo [ $F(1,27)=1,221$ ,  $p=0,279$ ] ou do tratamento [ $F(1,27)=0,7639$ ,  $p=0,389$ ], Figura 7 A. Porém, com relação ao tempo de auto-limpeza (comportamento hedônico) há um efeito significativo do genótipo [ $F(1,27)=45,12$ ,  $p<0,0001$ ] e do tratamento [ $F(1,27)=15,47$ ,  $p=0,0005$ ], além de uma interação significativa entre o genótipo e o tratamento [ $F(1,27)=32,58$ ,  $p<0,0001$ ]. Além disso, a análise de *post-hoc* de Bonferroni usada para múltiplas comparações entre os quatro grupos experimentais confirma os resultados anteriores, que os animais CD300f<sup>-/-</sup> tratados com veículo apresentaram um decréscimo significativo ( $p<0,0001$ ) no tempo de autolimpeza quando comparados ao grupo de animais selvagens, e demonstra ainda que esse efeito é revertido no grupo de animais CD300f<sup>-/-</sup> tratados com bupropiona ( $p=0,00068$ ), Figura 7B. Os resultados demonstram que a diminuição nos níveis de noradrenalina evidenciados nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> estão associados a um comportamento anedônico que pode ser melhorado com a inibição da recaptação da mesma na fenda sináptica.

**Figura 7. O tratamento agudo com bupropiona melhora o comportamento anedônico nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> com 5 meses de idade**



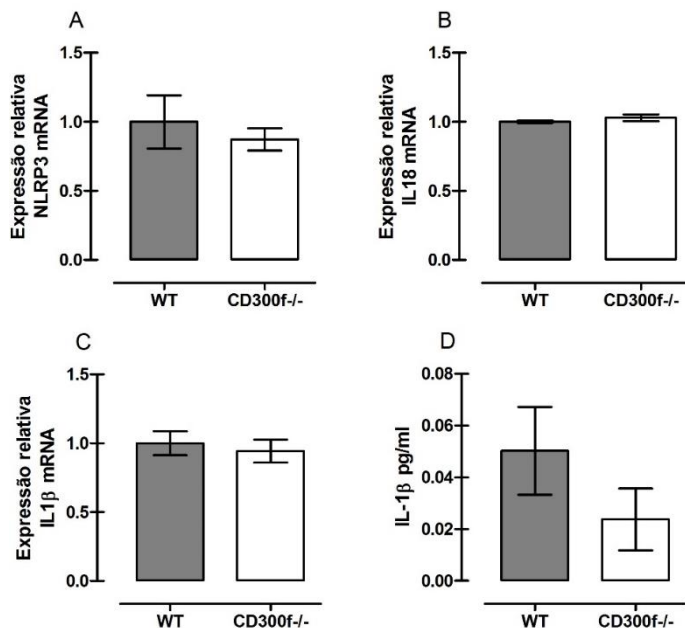
**Legenda:** Os animais foram tratados com bupropiona (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS 1x, i.p.) e avaliados no teste de borrfagem de sacarose 30 minutos após o tratamento. A latência para começar o comportamento de autolimpeza foi analisada para avaliar o comportamento motivacional e de auto-cuidado (A) e o tempo total (segundos) de autolimpeza (B) foi analisado para avaliar a resposta hedônica a uma solução palatável de sacarose (WT, n=15; CD300f<sup>-/-</sup>, n=16). Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa  $p<0,05$  comparado ao grupo WT + Veículo e § representa  $p<0,05$  comparado ao grupo CD300f<sup>-/-</sup> + Bup 10. WT: Animais selvagens; CD300f<sup>-/-</sup>: Animais nocaute para o gene CD300f; Bup 10: Bupropiona 10 mg/kg; Veic: Veículo; i.p.: Intraperitoneal.

## **2.5. Alterações inflamatórias nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup>**

### **2.5.1. Envolvimento da via do inflamassoma NLRP3**

Tendo em vista a participação dos imunorreceptores CD300f na modulação de respostas inflamatórias, o próximo passo foi avaliar as alterações inflamatórias associadas à depleção dos imunorreceptores CD300f que poderiam estar mediando os efeitos comportamentais observados. As Figuras 8 e 9 apresentam a expressão de diferentes genes com o intuito de avaliar se a depleção do imunorreceptor CD300f poderia alterar a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em homogenato de cérebro total, com foco na via do inflamassoma NLRP3. A Figura 8 apresenta a expressão gênica relativa dos genes da via do inflamassoma NLRP3 no cérebro dos animais CD300f<sup>-/-</sup> e selvagens. Pôde-se observar que os animais CD300f<sup>-/-</sup> não apresentam diferenças na expressão gênica (Figura 8A) do inflamassoma *NLRP3* ( $t(13)=0,643$ ,  $p=0,531$ ) quando comparados aos animais selvagens. Além disso, não há diferenças entre os genótipos em relação à expressão gênica das interleucinas *IL18* ( $t(5)=1,343$ ,  $p=0,237$ , Figura 8B) e *IL1β* ( $t(46)=0,464$ ,  $p=0,644$ , Figura 8C), que são ativadas pela ação do inflamassoma NLRP3. Também, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis proteicos de IL-1β ( $t(6)=0,109$ ,  $p=0,317$ ) avaliados por ELISA em homogenatos de hipocampo (8D). Esses resultados indicam que a ausência do imunorreceptor CD300f em fêmeas parece não alterar a via inflamatória conduzida pelo inflamassoma NLRP3.

**Figura 8: Efeito da depleção genética dos receptores CD300f<sup>-/-</sup> na sinalização mediada pelo inflamassoma NLRP3**



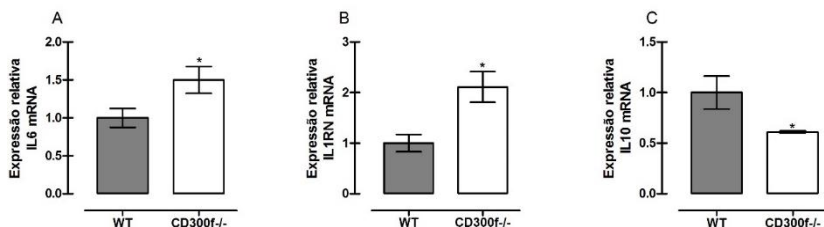
**Legenda:** A expressão relativa do gene do inflamassoma *NLRP3* (WT, n=7; CD300f<sup>-/-</sup>, n=8, Figura A), e das citocinas pró-inflamatórias *IL18* (WT, n=4; CD300f<sup>-/-</sup>, n=3, Figura B) e *IL1β* (WT, n=24; CD300f<sup>-/-</sup>, n=24, Figura C) em homogenato de cérebro total dos animais são demonstradas. Os valores de expressão gênica foram corrigidos pela expressão relativa de *GADPH* como controle. Os níveis proteicos totais de IL-1β (WT, n=5; CD300f<sup>-/-</sup>, n=3, Figura D) no hipocampo também são demonstrados. Os dados estão representados como média±E.P.M. *NLRP3*: Família de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3; *IL18*: Interleucina-18, *IL1β*: Interleucina-1β, *GADPH*: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; WT: Animais selvagens; CD300f<sup>-/-</sup>: Animais nocaute para o gene *CD300f*.

### 2.5.2. Envolvimento de outras citocinas inflamatórias

Tendo em vista que a via do inflamassoma NLRP3 parece não estar envolvida no efeito comportamental observado em camundongos fêmeas CD300f<sup>-/-</sup>, a expressão de outras citocinas pró- e anti-inflamatórias foram avaliadas em homogenatos de cérebro total. A Figura 9A exibe a expressão gênica relativa do gene da citocina pró-inflamatória *IL-6*, demonstrando um aumento significativo na expressão gênica dessa citocina quando comparada aos animais WT ( $t(7)=2,371$ ,

$p=0,04$ ). Além disso, o antagonista do receptor da *IL-1* (*ILIRN* ou *ILIRA*) estava significativamente aumentado em homogenatos de cérebro total dos animais *CD300f<sup>-/-</sup>* quando comparado aos selvagens ( $t(6)=3,206$ ,  $p=0,018$ , Figura 9B). Ainda, a citocina anti-inflamatória *IL10* também apresentou uma diminuição significativa nos animais *CD300f<sup>-/-</sup>* quando comparadas aos selvagens ( $t(6)=2,387$ ,  $p=0,054$ , Figura 9C). Esses resultados indicam que os animais *CD300f<sup>-/-</sup>* apresentam pequenas alterações no perfil inflamatório, especialmente em citocinas que não estão diretamente associadas à ativação via complexo NLRP3.

**Figura 9. Sinalização mediada por outras citocinas no cérebro das fêmeas *CD300f<sup>-/-</sup>***



**Legenda:** A expressão relativa do gene da citocina pró-inflamatória *IL6* (WT,  $n=5$ ; *CD300f<sup>-/-</sup>*,  $n=4$ , Figura A), do antagonista *ILIRN* (WT,  $n=4$ ; *CD300f<sup>-/-</sup>*,  $n=4$ , Figura B) e da citocina anti-inflamatória *IL10* (WT,  $n=24$ ; *CD300f<sup>-/-</sup>*,  $n=24$ , Figura C) no cérebro total dos animais são demonstradas. Os valores de expressão gênica foram corrigidos pela expressão relativa de *GADPH* como controle. Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa  $p\leq 0,05$  comparado ao WT. *IL6*: Interleucina 6; *ILIRN*: Antagonista do receptor da *IL-1*; *IL10*: Interleucina-10; *GADPH*: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; WT: Animais selvagens; *CD300f<sup>-/-</sup>*: Animais nocaute para o gene *CD300f*.

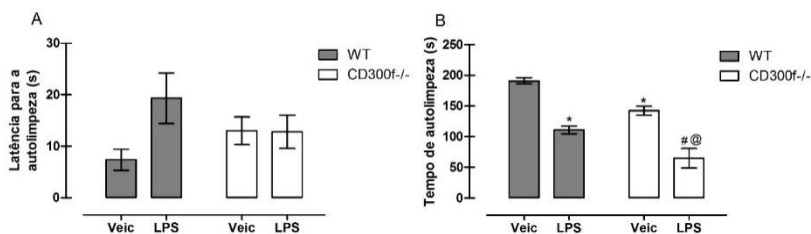
### 2.5.3. Efeitos comportamentais da administração de lipopolissacarídeo em fêmeas *CD300f<sup>-/-</sup>*

Uma vez que apenas pequenas alterações nas citocinas inflamatórias foram encontradas, o próximo passo foi avaliar a resposta dos animais *CD300f<sup>-/-</sup>* à um desafio com LPS, caracterizado por induzir inflamação e alterações comportamentais que se assemelham àquelas observadas na depressão. A Figura 10 apresenta o comportamento das fêmeas *CD300f<sup>-/-</sup>* e selvagens no teste de borrifagem de sacarose 24h após o tratamento com LPS (2 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS 1x, i.p.). Observou-se uma tendência para uma interação significativa entre o genótipo e o tratamento [ $F(1,35)=3,366$ ,  $p=0,075$ ] e para o efeito do



tratamento [F(1,35)=3,147, p=0,084], contudo, não observou-se efeito do genótipo [F(1,35)=0,019, p=0,886] no tempo de latência para começar o comportamento de auto-limpeza (Figura 10A). Quando analisamos o tempo total do comportamento de auto-limpeza (Figura 10B), verifica-se um efeito significativo do genótipo [F(1,35)=23,45, p<0,0001], bem como do tratamento [F(1,35)=65,07, p<0,0001], porém não encontrou-se uma interação significativa entre genótipo e tratamento [F(1,35)=0,020, p=0,886]. A análise de *post-hoc* confirmou que os animais CD300f<sup>-/-</sup> apresentaram menor tempo de auto-limpeza comparado aos animais selvagens (p=0,0062 comparando WT + Veic com CD300f<sup>-/-</sup> + Veic). Ainda, o teste de *post-hoc* revelou que o tratamento com LPS diminuiu significativamente o tempo de auto-limpeza dos animais selvagens quando comparados aos seus respectivos controles tratados com veículo (p<0,00001). Além disso, o tratamento com LPS também levou a uma diminuição do tempo de auto-limpeza dos animais CD300f<sup>-/-</sup> quando comparados aos animais CD300f que receberam veículo (p<0,00001). Interessantemente, as fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> que receberam LPS mostraram uma diminuição mais exacerbada no comportamento de auto-limpeza quando comparadas às fêmeas selvagens que também receberam LPS (p=0,014), indicando que o tratamento com LPS induz um comportamento anedônico que é exacerbado nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup>.

**Figura 10. O tratamento com LPS exacerba o comportamento anedônico nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> com 5 meses de idade**



**Legenda:** Os animais foram tratados com LPS (2 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS 1x, i.p.) e avaliados no teste de borrfagem de sacarose 24 horas após o tratamento. A latência para começar o comportamento de autolimpeza (WT + Veic, n=11; WT + LPS, n=9; CD300f<sup>-/-</sup> + Veic, n=10; CD300f<sup>-/-</sup> + LPS, n=10) foi analisada para avaliar o comportamento motivacional e de auto-cuidado (A). O tempo total (segundos) de autolimpeza (WT + Veic, n=10; WT + LPS, n=9; CD300f<sup>-/-</sup> + Veic, n=10; CD300f<sup>-/-</sup> + LPS, n=9) foi analisado para avaliar a resposta hedônica a uma solução palatável de sacarose (B). Os dados estão representados como média±E.P.M. \* representa p<0,05 comparado ao grupo

WT + Veic, # representa  $p < 0,05$  comparado ao grupo CD300f<sup>-/-</sup> + Veic e @ representa  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo WT + LPS. TBS: Teste de borrifagem de sacarose; WT: Animais selvagens; CD300f<sup>-/-</sup>: Animais nocaute para o gene CD300f; LPS: Lipopolissacarídeo; PBS: Tampão fosfato-salino; i.p: Intrapéritoneal.

### 3. Discussão

O principal achado do presente estudo foi o envolvimento dos imunorreceptores CD300f no controle de comportamentos associados ao TDM como comportamento depressivo e anedônico em fêmeas. Além disso, o tratamento com LPS, utilizado como um modelo de depressão associada à inflamação, levou a uma exacerbação da anedonia em animais CD300f<sup>-/-</sup> quando comparado aos animais selvagens. Além das alterações comportamentais, foi encontrada uma diminuição nos níveis de noradrenalina no hipocampo e alterações em algumas citocinas como aumento da expressão de *IL-6* e *IL1RN* e redução na expressão de *IL-10* no cérebro total. Contudo, a via do inflamassoma NLRP3 não foi alterada.

A inflamação de baixo grau tem sido associada ao TDM e observada em diferentes modelos pré-clínicos de depressão, como no ECI (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2016), na separação materna (ROQUE, OCHOA-ZARZOSA e TORNER, 2016), modelo de bulbectomia olfatória (YANG *et al.*, 2014) e de administração de LPS (ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, alterações comportamentais também foram observadas em camundongos transgênicos com depleção de moléculas anti-inflamatórias como a citocina *IL-4* (MOON *et al.*, 2015). Por outro lado, quando a depleção gênica de moléculas pró-inflamatórias é realizada, como *IL-6*, *TNFR1* e *NLRP3*, observa-se um fenótipo antidepressivo (ALCOCER-GÓMEZ *et al.*, 2016; KASTER *et al.*, 2012; CHOURBAJI *et al.*, 2006). No presente estudo, o aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado em fêmeas com 5 e 18 meses de idade sugere um fenótipo depressivo nos animais CD300f<sup>-/-</sup>. Esse comportamento pode estar relacionado ao aumento ou disfunção das respostas inflamatórias normais. De fato, apesar dos efeitos duais descritos para os imunorreceptores CD300f na ativação ou inibição de respostas imunes, a maioria dos estudos apontam para uma importante atividade anti-inflamatória orquestrada por esses imunorreceptores (SHIBA *et al.*, 2017; PELUFFO *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2011). A ativação de receptores CD300f induz o recrutamento de fosfatases como *SHP-1* e *SHP-2* e da proteína quinase *PI3K* (IZAWA *et al.*, 2014; IZAWA *et al.*, 2012), o que leva à regulação do *TLR-4* e do

NF- $\kappa$ B, inibindo ainda mais o processo inflamatório (SHIBA *et al.*, 2017; MATSUKAWA *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2011). Assim, a depleção genética global dos imunorreceptores CD300f pode prejudicar a capacidade do organismo de neutralizar a inflamação, levando consequentemente a um fenótipo depressivo associado a disfunções imunológicas. Vale ressaltar que esses efeitos comportamentais foram observados apenas em fêmeas. As diferenças de sexo em relação ao TDM e a inflamação são consistentes e já foram reportadas em diversos estudos (VETTER *et al.*, 2013; ELOVAINIO *et al.*, 2009; FORD e ERLINGER, 2004).

Outro achado importante do presente estudo foi o aumento da latência para iniciar o comportamento de auto-limpeza no teste de borrifagem de sacarose, indicando uma diminuição da motivação e também a diminuição do tempo total de auto-limpeza observado nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> com 5 e 18 meses de idade, indicando um comportamento anedônico. Mudanças nos processos motivacionais / hedônicos são sintomas centrais do TDM e estão associadas a mudanças nos circuitos neurais meso-cortico-límbicos (SWARDFAGER *et al.*, 2016; BERRIDGE e KRINGELBACH, 2015). O papel da inflamação na anedonia tem sido amplamente discutido na literatura e foi recentemente revisado por SWARDFAGER e colaboradores (2016). Enquanto mudanças transitórias nos processos motivacionais e hedônicos são frequentemente associadas à inflamação em infecções agudas e doenças, um termo coletivo definido como comportamento de doença (*do inglês: Sickness Behavior*), a ativação exagerada ou prolongada dessas respostas imunes pode comprometer o SNC, levando a sintomas psiquiátricos em vez do comportamento adaptativo da doença (FELGER e LOTRICH, 2013; MAES *et al.*, 2012; DANTZER *et al.*, 2008). KOO e DUMAN (2008) demonstraram que o bloqueio da sinalização de IL-1 $\beta$  evita os efeitos anedônicos em um modelo animal de depressão induzida pelo ECI. Além disso, em um ensaio clínico randomizado, EISENBERGER e colegas (2010) mostraram que a administração de endotoxina levou a inflamação e anedonia, e que esses efeitos estavam associados a mudanças na atividade do circuito neural associado ao sistema de recompensa (EISENBERGER *et al.*, 2010). Outras alterações comportamentais como na locomoção espontânea, habituação e ansiedade/compulsão não foram observadas nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup>.

Esta é a primeira caracterização comportamental dos animais com depleção genética do imunorreceptor CD300f. O fenótipo comportamental observado pode estar relacionado ao rompimento do

controle de processos inflamatórios mediados por esses receptores em células imunes ou em células do SNC onde parecem ter um papel protetor contra a lesão (LIMA *et al.*, 2017; PELUFFO *et al.*, 2012). Nesse sentido, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de noradrenalina no hipocampo. A noradrenalina está relacionada à regulação da cognição, motivação e interação social (CHANDLER *et al.*, 2014). Sabe-se que o estresse crônico pode induzir uma neurodegeneração no locus coeruleus, implicando em um dano nos neurônios noradrenérgicos o que pode levar a uma diminuição nos níveis de noradrenalina liberados, podendo resultar em comportamentos depressivos e anedônicos (CHANDLER *et al.*, 2014; MORET e BRILEY, 2011). Estudos que utilizam a depleção de noradrenalina no encéfalo como modelo experimental resultam no retorno dos sintomas depressivos que já haviam sido diminuídos após um tratamento efetivo com antidepressivos que atuam sobre o sistema noradrenérgico (MORET e BRILEY, 2011). Para verificar a associação entre os níveis diminuídos de noradrenalina no hipocampo com as alterações comportamentais encontradas, realizou-se um tratamento agudo com bupropiona (10 mg/kg), um antidepressivo inibidor da recaptção de dopamina e noradrenalina e observou-se que o tratamento melhorou significativamente o prejuízo comportamental observado no teste de borrifagem de sacarose, reforçando a relação da noradrenalina nos processos hedônicos observados no TDM (DER-AVAKIAN *et al.*, 2012)

Além disso, visto que o imunorreceptor CD300f tem um papel majoritariamente anti-inflamatório, verificamos uma possível hiperativação do complexo inflamassoma NLRP3 no cérebro dos animais, contudo não observamos diferenças significativas na expressão gênica das proteínas envolvidas nessa via quando comparadas aos animais selvagens. Por outro lado, encontramos um aumento significativo na expressão gênica da interleucina pró-inflamatória *IL-6* nos animais CD300f<sup>-/-</sup>. Estudos têm elucidado um papel importante da *IL-6* na fisiopatologia do TDM, visto que meta-análises demonstram que pacientes com TDM apresentam um aumento nos níveis periféricos de *IL-6* (GOLDSMITH *et al.*, 2016; STRAWBRIDGE *et al.*, 2015; DOWLATI *et al.*, 2010). Ainda, estudos pré-clínicos demonstraram que níveis elevados de *IL-6* estão associados à suscetibilidade ao estresse de derrota social em camundongos (HODES, MENARD, RUSSO, 2016), um efeito que foi revertido pela administração sistêmica de um anticorpo anti-*IL-6*, sugerindo que o bloqueio dessa interleucina pode ser promissor no tratamento do TDM (ZHANG *et al.*, 2017). Outro

achado interessante é que os animais CD300f<sup>-/-</sup> apresentaram um aumento na expressão gênica do antagonista do receptor *IL1* (*IL1RN* ou *IL1RA*). Esse antagonista é um membro da família IL-1 e se liga a receptores IL-1, contudo não induz nenhuma resposta intracelular. Diversas moléculas podem induzir a produção de IL1RN, incluindo várias citocinas, produtos virais, proteínas de fase aguda, IgG, LPS, GM-CSF e IL-4, indicando que esta citocina pode ser produzida rapidamente em situações inflamatórias ou infecciosas (AREND *et al.*, 1998). De fato, um aumento do RNAm de *IL1RA* nos linfócitos periféricos de pacientes *post mortem* com TDM foi identificado, demonstrando o envolvimento dessa citocina em transtornos psiquiátricos (PANDEY, 2017). Além disso, uma metanálise conduzida com 82 estudos mostrou que a citocina IL1RA apresenta níveis periféricos aumentados nos pacientes com TDM quando comparado aos controles saudáveis (KÖHLER *et al.*, 2017). Nesse sentido, a citocina IL1RN tem a capacidade de ligação ao receptor IL1R com a mesma afinidade que a IL-1 $\beta$  e, portanto, pode neutralizar os efeitos inflamatórios mediados pela sinalização da IL-1 $\beta$  nas células-alvo (SCULLY, 2014).

Outra citocina anti-inflamatória importante é a IL-10, que neste estudo apresentou expressão gênica diminuída no homogenato total do cérebro dos animais CD300f<sup>-/-</sup> quando comparados aos animais selvagens. A modulação da IL-10 tem impacto sobre diversos sintomas associados com a depressão como desamparo, distúrbios do sono e percepção da dor (ROQUE *et al.*, 2009) e animais nocautes para a IL-10 apresentam fenótipo depressivo (MESQUITA *et al.*, 2008). Apesar de a IL-10 não estar alterada em uma meta-análise conduzida com 16 estudos (DOWLATI *et al.*, 2010), existem evidências na literatura sobre a importância desta citocina anti-inflamatória no TDM. Recentemente, um estudo demonstrou que a resolução do comportamento depressivo induzido por LPS associado a um aumento na enzima indoleamina 2,3 dioxigenase no córtex pré-frontal requer a sinalização mediada pela IL-10 em linfócitos T acumulados nas meninges (LAUMET *et al.*, 2018). Nesse sentido, a diminuição de IL-10 observada nos animais com depleção genética do imunorreceptor CD300f pode indicar uma falha de resolução da inflamação moderada observada nesses animais.

Considerando que as fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> apresentam um comportamento depressivo e anedônico a nível basal, utilizou-se um modelo de depressão associada à inflamação induzido por LPS para verificar se a depleção genética dos imunorreceptores CD300f poderia exacerbar a resposta comportamental quando comparado aos animais

selvagens. Uma única administração de LPS induziu um comportamento anedônico nos animais selvagens no teste de borrifagem de sacarose. Esse efeito em animais selvagens já foi extensivamente relatado na literatura (SOUSA *et al.*, 2018; TANIGUTI *et al.*, 2018). Contudo, as fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> apresentaram um comportamento anedônico mais exacerbado quando comparadas aos animais selvagens, indicando que a ausência do imunorreceptor CD300f causa um prejuízo comportamental maior nos animais. No entanto, a relação comportamental e neuroquímica/inflamatória dos animais CD300f<sup>-/-</sup> submetidos ao modelo de depressão induzida por LPS precisa ser melhor investigado no futuro. Além disso, a respostas das fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> frente a outros modelos de depressão como o ECI, estresse agudo ou depressão induzida por corticosterona precisa ser avaliado.

Nesse sentido, os nossos dados demonstram que os imunorreceptores CD300f estão envolvidos na modulação do humor e dos processos hedônicos por mecanismos possivelmente associados ao controle da disfunção imune e neurotransmissão monoaminérgica. No entanto, mais estudos são necessários para entender melhor os mecanismos de sinalização e os tipos de células envolvidas nesses efeitos e o possível impacto dessa via como estratégia terapêutica para o TDM.

## **2. Estudo em humanos: Polimorfismo nos receptores CD300f e proteção contra o Transtorno Depressivo Maior em um estudo transversal de base populacional**

Os imunorreceptores CD300 compreendem uma família de proteínas responsáveis por ajustar, direcionar ou finalizar as respostas imunes (CLARK *et al.*, 2009). Dentro da família dos receptores CD300, os imunorreceptores CD300f parecem agir como reguladores anti-inflamatórios, uma vez que seu bloqueio aumenta a neuroinflamação (IZAWA *et al.*, 2012; PELUFFO *et al.*, 2012; XI *et al.*, 2010). Em estudos anteriores, observou-se que um aumento na expressão do CD300f foi capaz de diminuir a área lesionada após excitotoxicidade cerebral induzida em camundongos (PELUFFO *et al.*, 2012). Além disso, astrócitos transfectados com CD300f diminuíram a perda neuronal induzida pelo peptídeo A $\beta$  em co-culturas, mostrando um papel neuroprotetor para esses receptores na doença de Alzheimer (LIMA *et al.*, 2017). Apesar dessa evidência inicial, a informação sobre os possíveis papéis biológicos e patológicos dos imunorreceptores CD300f no controle de processos inflamatórios no SNC é escassa.

A família multigênica humana dos imunorreceptores CD300 possui 7 membros localizados no cromossomo 17 (CLARK *et al.*, 2009). Estudos de associação genômica revelaram que o loci 17q25.1, onde o gene do imunoreceptor *CD300f* está localizado, estavam associados a um maior status inflamatório e risco de trombose (DANIK *et al.*, 2009). Curiosamente, a localização do genoma 17q foi previamente associada à psoríase (NAIR *et al.*, 1997). Além disso, o SNP rs2034310 no gene do imunoreceptor de *CD300f* foi associado à esclerose múltipla (BAN *et al.*, 2010). Apesar das evidências que demonstram um papel neuroprotetor e anti-inflamatório dos imunorreceptores CD300f, até o momento não foram realizados estudos para avaliar seu papel em transtornos psiquiátricos como o TDM, o qual apresenta um perfil inflamatório constante e de baixo grau. Assim, este é um estudo transversal de base populacional que foi desenhado para avaliar a possível associação do SNP rs2034310 no gene do imunoreceptor *CD300f* com o TDM.

### **1.Métodos**

#### **1.1. Delineamento do estudo e participantes**

Este é um estudo transversal de base populacional que envolveu 1.110 indivíduos com idade entre 18 e 35 anos residentes na cidade de

Pelotas-RS e recrutados entre junho de 2011 e maio de 2013. A seleção da amostra foi realizada por conglomerados, considerando uma população de 97.000 indivíduos nos 495 setores censitários da cidade. Para garantir a inclusão amostral necessária, 82 setores censitários foram sistematicamente desenhados. Após a identificação, os participantes receberam visitas matinais de pesquisadores treinados, a fim de coletar informações sociodemográficas e clínicas. Diversas variáveis como etnia, uso de medicação psiquiátrica e comorbidades clínicas foram autorrelatadas. O IMC foi calculado pela equação: peso (kg) / altura (m<sup>2</sup>). Os indivíduos foram diagnosticados com o TDM (episódio atual ou passado) através da entrevista de diagnóstico estruturada *Mini International Neuropsychiatric Interview*, de acordo com os critérios do DSM-5 (MINI 5.0., Versão brasileira/DSM-5, Medical Outcome Systems Inc., Jacksonville, FL, EUA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica de Pelotas (2010/15) e todos os pacientes forneceram consentimento informado por escrito para participar.

### **1.2. Coleta de amostra de sangue**

Dez mililitros de sangue foram coletados logo após a entrevista (8:00-11:00) por punção venosa em um tubo de vácuo livre de anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas (3.500 g, à temperatura ambiente) para a coleta dos leucócitos do sangue periférico que foram utilizados para posterior extração de DNA e o soro foi separado e mantido congelado a -80°C até a análise bioquímica.

### **1.3. Genotipagem**

O sangue foi centrifugado (3.500 g, à temperatura ambiente) imediatamente após a coleta e a fração enriquecida com leucócitos do sangue periférico foi isolada para extração de DNA, utilizando-se o procedimento previamente descrito por LAHIRI & NURNBERGER (1991). O SNP no gene do *CD300f* rs2034310 (C/T) tem uma frequência alélica menor (0,1725) na população europeia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). O SNP foi genotipado usando sondas contendo 40x Human Custom TaqMan Genotyping Assay (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Os iniciadores utilizados foram: 5'-CCG GGT TCA ATC AAT TCT CCT-3' (senso) e 5'-CGG GCG TGG AGG TGC AAT G-3' (anti-senso). Uma sonda alélica foi marcada com o fluorocromo VIC e a outra foi marcada com FAM. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando 5 µl de volume de DNA por poço contendo 2 ng de DNA genômico de



cada indivíduo, TaqMan Genotyping Master Mix 1x (Applied Biosystems) e Custom TaqMan Genotyping Assay 1x. As placas de 96 poços foram posteriormente posicionadas em um termociclador de PCR em tempo real (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems) e aquecidas por 10 min a 95°C, seguidas de 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min. Os arquivos de dados de fluorescência de cada placa foram analisados usando um software para identificação automática de alelos (SDS 2.0.1; Applied Biosystems).

#### 1.4. ELISA

Uma subamostra representativa de 167 indivíduos foi utilizada para a avaliação dos níveis periféricos de IL-1 $\beta$  de acordo com o genótipo e o diagnóstico. O tamanho dessa subamostra foi calculado com base nos valores da média e do desvio padrão dos níveis séricos de IL-1 $\beta$  nos controles e nos indivíduos com TDM, usando um nível de significância ( $\alpha$ ) ajustado em 5% e potência (1- $\beta$ ) definida como 80% através do Programa Openepi (HUANG e LEE, 2007; MOTA *et al.*, 2013). Esses 167 indivíduos foram selecionados considerando a mesma proporção de gênero e etnicidade e divididos em dois grupos, 91 controles e 76 indivíduos com TDM. Os níveis séricos de IL-1 $\beta$  foram medidos usando kits de imunoensaio específicos (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., EUA). A placa foi selada 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, pH 7,4) e posteriormente foi bloqueada 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 avidina-horseradish (100  $\mu$ l por poço) por 30 minutos. Após este período a placa foi lavada com tampão de lavagem por 5 vezes e adicionou-se 100  $\mu$ l de TMB solution 1x por poço, o qual ficou incubando por 15 minutos. Ao final, a reação foi parada utilizando 50  $\mu$ l por poço de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a placa foi lida em um espectrofotômetro à 450 nm. O coeficiente de variação intra-ensaio (C.V.) foi inferior a 5% e o

ensaio inter-ensaio C.V. foi inferior a 10%. Os valores foram expressos em pg/mL.

### 1.5. Análises estatísticas

As frequências alélicas foram determinadas por contagem gênica, e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificados por meio do teste  $\chi^2$ . Comparações de frequências alélicas e genotípicas entre pacientes com TDM e controles foram avaliadas usando o teste do  $\chi^2$ . As características sociodemográficas segundo o diagnóstico e o genótipo foram analisadas pelo teste do  $\chi^2$ . As variáveis contínuas foram avaliadas usando o teste t de Student e ANOVA de uma via, seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni, conforme apropriado. Os níveis de IL-1 $\beta$  apresentaram distribuição não-gaussiana e foram logaritmicamente transformados para realização de análise paramétrica. A magnitude da associação entre os diferentes genótipos e o TDM foi estimada por meio da razão de chances (RC) com IC de 95%, ajustada pela idade, sexo, tabagismo, etnia, uso de medicação psiquiátrica e TDM através da análise de regressão logística. A correção de Bonferroni foi usada para contabilizar comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistical Program for Social Sciences 20.0 (SPSS 20.0) e os dados foram apresentados como média $\pm$ E.P.M. ou porcentagem (%), considerando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## 2. Resultados

Este estudo envolveu um total de 1.110 indivíduos, 625 controles sem diagnóstico de TDM e 485 com diagnóstico de TDM. As informações sociodemográficas de acordo com o diagnóstico estão descritas na Tabela 1. Observou-se uma alta prevalência de TDM em mulheres ( $p < 0,001$ ) e entre fumantes ( $p < 0,001$ ). Na população estudada, encontrou-se uma tendência para um valor significativo para as variáveis de idade e classe socioeconômica, sendo os indivíduos com TDM um pouco mais velhos que os controles ( $p = 0,057$ ) e pertencentes a uma classe socioeconômica mais baixa ( $p = 0,057$ ). Além disso, encontrou-se maior prevalência de uso de medicação psiquiátrica entre os indivíduos com TDM quando comparados aos controles, como esperado ( $p < 0,001$ ). Entretanto, é importante ressaltar que, mesmo no grupo com TDM, o uso de medicação psiquiátrica foi muito baixo (12,2%). Outras variáveis como IMC ( $p = 0,945$ ), etnia ( $p = 0,611$ ) e níveis séricos da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  ( $p = 0,517$ ), não foram estatisticamente diferentes de acordo com o diagnóstico. A presença de

comorbidades clínicas, incluindo condições inflamatórias, metabólicas e infecciosas, foi autorrelatada nesta população. Não se observou diferença significativa entre os pacientes do grupo controle e com TDM quanto à presença das comorbidades clínicas ( $p=0,626$ ).

**Tabela 1. Características sociodemográficas e clínicas da amostra de acordo com o diagnóstico para o Transtorno Depressivo Maior**

Transtorno Depressivo Maior			
Características	Não	Sim	Valor de p
Idade em anos (média ± E.P.M.)	25,66±0,21	26,28±0,24	0,057
Sexo (% mulheres)	301 (48,2)	321 (66,3)	<0,001
Etnia (% não caucasiano)	154 (24,6)	112 (23,1)	0,611
Classe socioeconômica			
Baixa	111 (17,8)	110 (22,8)	0,057
Intermediária	313 (50,1)	242 (50,1)	
Alta	201 (32,2)	131 (27,1)	
Uso de tabaco (% sim)	114 (18,3)	139 (28,9)	<0,001
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	26,07±0,20	26,05±0,25	0,555
Medicação psiquiátrica	26 (4,2)	59 (12,2)	<0,001
Doenças clínicas (% sim)	74 (11,8)	52 (10,7)	0,626
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	10,22±1,348	10,98±1,51	0,517
Total	625 (56,3)	485 (43,7)	

**Legenda:** Os dados estão representados como média ± E.P.M. ou n (%). \* Os valores de p foram computados usando o teste de  $\chi^2$  ou teste t de Student, como apropriado. Os níveis de IL-1 $\beta$  estão expressos como média ± E.P.M. mas foram analisados após a transformação logarítmica. p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. *TDM: Transtorno Depressivo Maior; IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ .*

Ao analisar as variáveis sociodemográficas de acordo com a distribuição genotípica, não se encontrou diferenças para o gênero (p=0,860), classe socioeconômica (p=0,964), índice de massa corporal (p=0,524) e presença de comorbidades clínicas (p=0,697). No entanto, a etnia foi significativamente associada ao genótipo e a presença do alelo T foi significativamente maior em indivíduos não-brancos (p<0,001).

Além disso, as frequências genotípicas estavam de acordo com as previstas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para o SNP rs2034310 ( $\chi^2=0,032$ ,  $p=0,856$ ).

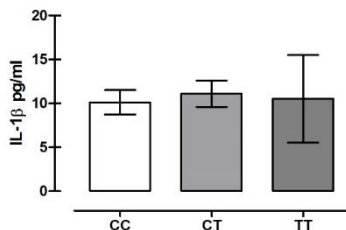
Ao avaliar as frequências genotípicas de acordo com o diagnóstico (Tabela 2), observou-se que o genótipo CT estava associado à proteção contra o TDM quando comparado ao genótipo CC [RC=0,693 (IC 95%: 0,538-0,891),  $p=0,004$ ]. Esta associação permaneceu significativa após o ajuste para idade, sexo, tabagismo e etnia [RC=0,698 (IC 95%: 0,539-0,903),  $p=0,006$ ]. Devido ao pequeno número de indivíduos com o genótipo TT, utilizou-se o modelo dominante agrupando os sujeitos CT e TT. A presença do alelo T (CT/TT) também conferiu proteção contra o TDM quando comparado ao genótipo CC [RC=0,736 (IC 95%: 0,578-0,937),  $p=0,013$ ]. Esses efeitos permaneceram independentemente associados à proteção contra o TDM após o ajuste para as mesmas variáveis descritas acima [RC=0,754 (IC 95%: 0,578-0,948),  $p=0,017$ ]. Além disso, os níveis séricos de IL-1 $\beta$  não diferiram [F(2,166)=0,109,  $p=0,896$ ] entre os genótipos do SNP rs2034310 no gene do *CD300f* (Figura 1).

**Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica de acordo com o diagnóstico para o Transtorno Depressivo Maior**

Transtorno Depressivo Maior					
Características	Não	Sim	Valor de p	RC não ajustada (IC 95%)/p*	RC ajustada (IC 95%)/p#
rs2034310 SNP					
Genótipo					
CC	336 (53,8)	297 (61,2)	0,110	1	1
CT	258 (41,3)	158 (32,6)		0,693 (0,538-0,891)/0,004	0,698 (0,539-0,903)/0,006
TT	31 (5,0)	30 (6,2)		1,095 (0,647-1,852)/0,736	1,096 (0,640-1,877)/0,738
Modelo dominante					
CC	336 (53,8)	297 (61,2)	0,015	1	1
CT/TT	289 (46,2)	188 (38,8)		0,736 (0,578-0,937)/0,013	0,740 (0,578-0,948)/0,017
Alelo					
C	0,744	0,775	0,110		
T	0,256	0,225			

**Legenda:** Os dados estão representados como n (%) ou proporção. \*Os valores de p foram computados usando o teste de  $\chi^2$  comparando pacientes com TDM e controles. #Os valores da RC (IC 95%/p) foram obtidos da análise de regressão logística ajustada para idade, sexo, uso de tabaco, etnia e uso de medicação psiquiátrica.  $p<0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. *TDM: Transtorno Depressivo Maior; RC: Razão de chances.*

**Figura 1: Níveis periféricos de IL-1 $\beta$  de acordo com o genótipo**



**Legenda:** Distribuição dos níveis séricos de IL-1 $\beta$  de acordo com os genótipos do polimorfismo rs2034310 (CC, n=85; CT, n=71; TT, n=11). Os resultados estão expostos como média $\pm$ E.P.M dos valores previamente transformados logaritmicamente. As diferenças foram analisadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* Bonferroni. *IL-1 $\beta$* : Interleucina-1 $\beta$ .

Posteriormente, realizou-se uma estratificação da amostra por sexo, visto que a prevalência de TDM é maior em mulheres e acredita-se que bases biológicas distintas podem estar associadas às características do TDM, severidade e resposta ao tratamento diferencial em homens e mulheres (SENEY *et al.*, 2018). A Tabela 3 apresenta as análises dos diferentes genótipos em relação ao diagnóstico de TDM em mulheres e em homens. Pode-se observar que o genótipo CT estava associado à proteção contra o TDM quando comparado ao genótipo CC (RC=0,585 IC 95%: 0,419-0,817, p=0,002) em mulheres, mesmo após o ajuste para as variáveis confundidoras (RC=0,592 IC 95%: 0,422-0,831, p=0,002). Quando se analisou os genótipos em um modelo dominante (CT/TT) observou-se um efeito significativo do alelo T conferindo proteção contra o TDM [RC=0,625 (IC 95%: 0,454-0,861), p=0,004]. Esse efeito permanece significativo mesmo após a análise ajustada [RC=0,632 (IC 95%: 0,457-0,874), p=0,006]. Por outro lado, não se observou nenhum efeito significativo do genótipo CT [RC=0,875 (IC 95%: 0,588-1,302), p=0,510] ou TT [RC=1,277 (IC 95%: 0,553-2,952), p=0,567] do SNP rs2034310 em relação ao TDM em homens, nem mesmo após a análise ajustada [RC=0,886 (IC 95%: 0,594-1,321), p=0,551] e [RC=1,307 (IC 95%: 0,564-3,029), p=0,533], respectivamente. Também não foi evidenciada nenhuma associação significativa no modelo dominante (CT/TT) não ajustado [RC=0,917 (IC 95%: 0,627-1,343), p=0,657] ou após ajuste para variáveis confundidoras [RC=0,929 (IC 95%: 0,634-1,364), p=0,708]. Esses resultados demonstram que o alelo T do SNP

rs2034310 (C/T) no imunorreceptor CD300f confere proteção contra o TDM apenas em mulheres.

**Tabela 3. Distribuição genotípica e alélica de acordo com o sexo e o diagnóstico para o Transtorno Depressivo Maior**

Características	Transtorno Depressivo Maior				
	Não	Sim	Valor de p	RC não ajustada (IC 95%)/p*	RC ajustada (IC 95%)/p#
<b>Mulheres:</b>					
rs2034310 SNP					
Genótipo					
CC	154 (51,2)	201 (62,6)	0,006	1	1
CT	131 (43,5)	100 (31,2)		0,585 (0,419-0,817)/0,002	0,592 (0,422-0,831)/0,002
TT	16 (5,3)	20 (6,2)		0,958 (0,480-1,910)/0,902	0,964 (0,481-1,935)/0,919
Modelo dominante					
CC	154 (51,2)	201 (62,6)	0,005	1	1
CT/CT	147 (48,8)	120 (37,4)		0,625 (0,454-0,861)/0,004	0,632 (0,457-0,874)/0,006
<b>Homens:</b>					
rs2034310 SNP					
Genótipo					
CC	182 (56,2)	95 (58,3)	0,626	1	1
CT	127 (39,2)	58 (35,6)		0,875 (0,588-1,302)/0,510	0,886 (0,594-1,321)/0,551
TT	15 (4,6)	10 (6,1)		1,277 (0,553-2,952)/0,567	1,307 (0,564-3,029)/0,533
Modelo dominante					
CC	154 (51,2)	201 (62,6)	0,657	1	1
CT/TT	147 (48,8)	120 (37,4)		0,917 (0,627-1,343)/0,657	0,929 (0,634-1,364)/0,708

**Legenda:** Os dados estão representados como n (%) ou proporção \*Os valores de p foram computados usando o teste de  $\chi^2$  comparando pacientes com TDM e controles em ambos os sexos. #Os valores da RC (IC 95%/p) foram obtidos da análise de regressão logística ajustada para idade, uso de tabaco, etnia e uso de medicação psiquiátrica.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. TDM: Transtorno Depressivo Maior; RC: Razão de chances.

### 3. Discussão

Os transtornos psiquiátricos têm sido frequentemente associados à disfunção do sistema imune e a um fenótipo pró-inflamatório caracterizado pela aparecimento de várias células inflamatórias ativadas e um aumento de mediadores inflamatórios tanto no SNC quanto na periferia (MUNKHOLM, VINBERG e KESSING, 2013; LOTRICH, 2012; KUNZ *et al.*, 2011; DOWLATI *et al.*, 2010; GOLDSTEIN *et al.*, 2009; SCHIEPERS, WICHERS, e MAES, 2005). No entanto, não está claro se a inflamação é um evento precoce crucial para a disseminação e amplificação da degeneração neuronal associada aos sintomas psiquiátricos ou mesmo se ela está presente em todos os

indivíduos acometidos pelo TDM. O presente estudo mostrou que a variabilidade genética em genes associados ao sistema imune pode apresentar um papel importante na heterogeneidade do TDM. O alelo T do polimorfismo rs2034310 no gene *CD300f* conferiu proteção contra o TDM em um estudo de base populacional incluindo 1.110 adultos jovens.

Mudanças polimórficas na região onde o gene *CD300f* está localizado já foram associadas a diversas condições inflamatórias, incluindo psoríase, inflamação, trombose, agregação plaquetária e esclerose múltipla (BAN *et al.*, 2010; DANIK *et al.*, 2009; NAIR *et al.*, 1997). Em um estudo de associação genômica avaliando 17.686 mulheres saudáveis, o *loci* 17q25.1 onde o gene do imunorreceptor CD300f está localizado, foi associado com níveis mais altos de proteína C reativa e fibrinogênio na trombose, agregação plaquetária e maior estado inflamatório (DANIK *et al.*, 2009). Curiosamente, a localização do genoma 17q foi previamente associada a outras doenças inflamatórias, como a psoríase (NAIR *et al.*, 1997). Além disso, o SNP (rs2034310) no imunorreceptor CD300f foi associado à esclerose múltipla, com o alelo T conferindo risco após uma análise combinada incluindo dados populacionais de três estudos (BAN *et al.*, 2010). No entanto, este é o primeiro estudo mostrando uma associação entre um polimorfismo no gene *CD300f* e o TDM.

Os resultados do presente estudo foram mais evidentes em mulheres, e o efeito observado na população geral é perdido nos homens após a estratificação. Isso pode ser devido à redução do poder estatístico após estratificação, uma vez que a amostra de mulheres é consideravelmente maior que a de homens. Contudo, essa pode ser uma alteração genética com um impacto neurobiológico maior em mulheres. De fato, as mulheres têm aproximadamente o dobro de probabilidade de serem diagnosticadas com TDM (HOEKSEMA, 2001), relatam maior gravidade de sintomas em comparação aos homens (KORNSTEIN *et al.*, 2000), e a fisiopatologia da depressão também pode diferir por sexo. Um estudo de expressão gênica em larga escala revelou múltiplas alterações na transcrição que variam em direções opostas entre homens e mulheres com TDM (SENEY *et al.*, 2018).

Apesar da provável importância dos imunorreceptores CD300f na regulação de condições inflamatórias, poucos estudos avaliaram seu papel no SNC. Um possível papel neuroprotetor tem sido descrito, uma vez que os receptores CD300f tem sua expressão aumentada no cérebro em um modelo de encefalomielite autoimune experimental, lesão cerebral aguda e após administração intraperitoneal de LPS (SHIBA *et*



*al.*, 2017; PELUFFO *et al.*, 2012; XI *et al.*, 2010). Além disso, altos níveis de imunorreceptores CD300f foram encontrados nos nervos periféricos após lesão, onde foi observado um papel na regulação e controle de processos de regeneração via regulação da migração e polarização de macrófagos (PELUFFO *et al.*, 2015).

Um estudo recente identificou que um polimorfismo diferente no gene do imunorreceptor CD300f (rs1411171369) causa uma troca dos aminoácidos arginina por glutamina na posição 33 (R33Q), o que resulta em uma diminuição da expressão do imunorreceptor CD300f na superfície dos monócitos periféricos de pacientes com esclerose múltipla, sugerindo que esta mutação pode afetar a estabilidade da proteína e comprometer as respostas anti-inflamatórias (MARTÍNEZ-BARRIOCANAL *et al.*, 2017). Contudo, ainda não existem estudos sobre a funcionalidade do polimorfismo avaliado no presente estudo, nem em termos de expressão do receptor ou das vias de sinalização recrutadas após ativação e seu papel no TDM. Vale ressaltar que as variantes genéticas do SNP rs2034310 (C/T) parecem não causar alterações nos níveis periféricos de IL-1 $\beta$  na população estudada, sugerindo ausência de uma exacerbação da resposta inflamatória mediada por essa interleucina. Contudo, os níveis de outras citocinas anti- e pró-inflamatórias precisam ser avaliadas.

As principais limitações do presente estudo consistem na falta de informações sobre a sinalização mediada pelos imunorreceptores CD300f e o impacto do polimorfismo avaliado nessa resposta. Está apenas se iniciando a entender o papel da família de receptores CD300 em condições fisiológicas e patológicas, bem como seu potencial como alvo terapêutico. Com base nos dados dos estudos pré-clínicos obtidos a partir de modelos de lesão aguda e doenças inflamatórias, precisa-se ampliar o conhecimento sobre o envolvimento da família CD300 em doenças humanas, e compreender os mecanismos associados com a resposta destes receptores na presença e na ausência de inflamação e seu potencial efeito diferencial de acordo com o gênero.

## 6. CONCLUSÃO

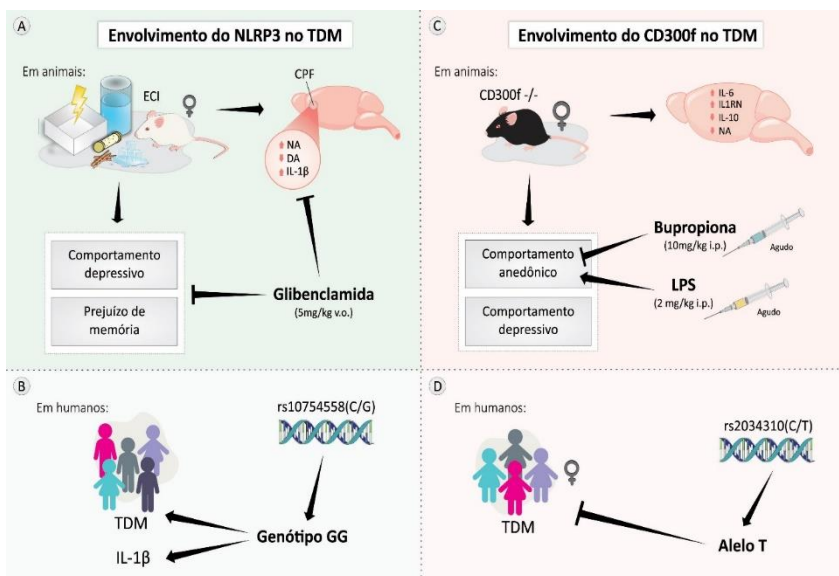
O presente trabalho reforçou o envolvimento de processos inflamatórios na patofisiologia do TDM através da participação da via inflamatória mediada pelo inflamassoma NLRP3 e do seu impacto em alterações neuroquímicas relevantes para o TDM, e abriu caminho para o estudo da via anti-inflamatória mediada pelos imunorreceptores CD300f na modulação das respostas comportamentais associadas ao TDM, uma via até então não estudada.

Os resultados em animais demonstram que o ECI induziu um comportamento depressivo e prejuízo de cognição, além de alterações no córtex pré-frontal como aumento dos níveis de noradrenalina, diminuição dos níveis de dopamina e aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ , sugerindo que o inflamassoma NLRP3 é ativado pelo ECI e leva a alterações monoaminérgicas. Por outro lado, o tratamento oral com glibenclamida por 21 dias, um inibidor do inflamassoma NLRP3, foi capaz de prevenir as alterações comportamentais, a diminuição de dopamina e o aumento de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal. Já no estudo em humanos, apesar de não encontrar-se uma associação entre os genótipos do polimorfismo no gene do inflamassoma NLRP3 (rs10754558, C/G) e o diagnóstico de TDM, observou-se que o genótipo GG está associado a um aumento significativo nos níveis séricos de IL-1 $\beta$  nos pacientes com TDM, desta forma, esses achados contribuem para desvendar a funcionalidade deste polimorfismo.

Além disso, demonstrou-se o que o imunorreceptor CD300f está envolvido na regulação do humor, uma vez que animais fêmeas com a depleção genética deste imunorreceptor (CD300f $^{-/-}$ ) apresentam comportamento depressivo e anedônico que são persistentes ao longo da idade, enquanto os machos não apresentam alterações comportamentais. As fêmeas CD300f $^{-/-}$  com 5 meses de idade também apresentaram um aumento no perfil inflamatório cerebral indicado pela expressão gênica das citocinas *IL-6*, *IL1RN* e *IL-10* e uma diminuição hipocampal de noradrenalina. O tratamento agudo com bupropiona levou a uma melhora significativa do comportamento anedônico enquanto que o tratamento com LPS induziu um comportamento anedônico exacerbado nas fêmeas CD300f $^{-/-}$  quando comparado aos animais selvagens, indicando que esses animais podem ser mais suscetíveis ao estresse e aos modelos de depressão. No estudo em humanos, observou-se uma importante associação do alelo T do polimorfismo no imunorreceptor CD300f (rs2034310, C/T) conferindo proteção contra a depressão em mulheres.

Em conjunto esses resultados reforçam o envolvimento de processos inflamatórios no TDM tanto em animais quanto em humanos. Porém vale ressaltar que o TDM é uma doença multifatorial, gerada não apenas pela interação entre o ambiente e os fatores genéticos, mas também pela influência de múltiplos genes com um efeito pequeno. Assim, essa interação entre a variabilidade genética, funcionalidade da resposta inflamatória e neurotransmissão pode ser fundamental para explicar a heterogeneidade observada em pacientes com TDM, e outros fenômenos como suscetibilidade diferencial ao estresse, respostas a fármacos anti-inflamatórios ou resistência ao tratamento com antidepressivos clássicos.

**Figura 1. Resumo dos resultados obtidos**



**Legenda:** O inflamassoma NLRP3 e o imunorreceptor CD300f estão envolvidos no TDM em animais e humanos. No estudo em roedores, observa-se que o ECI é capaz de induzir alterações comportamentais, monoaminérgicas e inflamatórias no córtex pré-frontal em camundongos *Swiss* fêmeas que são prevenidas pelo tratamento com glibenclamida, um inibidor do inflamassoma NLRP3 (A). Já em humanos, o genótipo GG do polimorfismo no gene do inflamassoma NLRP3 (rs10754558 C/G) está associado a um aumento nos níveis de IL-1β em pacientes com TDM (B). Além disso, animais fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> com 5 meses de idade apresentam alterações comportamentais associadas a um perfil inflamatório moderado no cérebro e alterações noradrenérgicas no hipocampo. O tratamento agudo com o antidepressivo

bupropiona melhora o comportamento anedônico enquanto que o tratamento com LPS exacerba este comportamento (C). Em humanos, o alelo T do polimorfismo no gene do imunorreceptor CD300f (rs2034310 C/T) está associado a um fator de proteção contra o TDM em mulheres (D).

## **7. PERSPECTIVAS**

### **Capítulo 1:**

- Avaliar o envolvimento da via do inflamassoma NLRP3 no ECI através da análise dos níveis de outras proteínas desta via como NLRP3, ASC, TLR4 e NFκB;

- Esclarecer a relação entre o inflamassoma NLRP3 e o sistema monoaminérgico, através da avaliação da atividade das enzimas de síntese de dopamina e noradrenalina (tirosina hidroxilase e dopamina β-hidroxilase);

- Verificar a modulação de outras citocinas inflamatórias pelo ECI e pelo tratamento com glibenclamida como as citocinas inflamatórias IL-18 e IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10.

### **Capítulo 2:**

- Avaliar o estado neuroinflamatório nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> em regiões encefálicas específicas que estão envolvidas com a regulação do humor como o córtex pré-frontal, hipocampo, núcleo accumbens e locus coeruleus;

- Esclarecer a relação entre o imunorreceptor CD300f e o sistema monoaminérgico, através da avaliação da atividade das enzimas de síntese de dopamina e noradrenalina (tirosina hidroxilase e dopamina β-hidroxilase);

- Avaliar as alterações neuroquímicas associadas ao comportamento anedônico induzido pela administração de LPS nas fêmeas CD300f<sup>-/-</sup>;

- Investigar o comportamento depressivo e anedônico das fêmeas CD300f<sup>-/-</sup> frente a outros modelos de depressão como o ECI, estresse agudo e o modelo de depressão induzida por corticosterona;

- Avaliar a funcionalidade do polimorfismo nos imunorreceptores CD300f.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAIS, J. M. et al. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 13, p. 1111-1129, 2015.

ABDUL SHUKKOOR M. S. et al. Antidepressant-like effect of lipid extract of channa striatus in chronic unpredictable mild stress model of depression in rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2016, 2016.

ADDOBBATI, C. et al. Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. **Inflammation Research**, v. 67, n. 3, p. 255-264, 2018.

ALBELDA, N.; JOEL, D. Animal models of obsessive-compulsive disorder: exploring pharmacology and neural substrates. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 36, n. 1, p. 47-63, 2012.

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

ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. **Brain, behavior, and immunity**, v. 36, p. 111-117, 2014.

ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Stress-induced depressive behaviors require a functional NLRP3 inflammasome. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 7, p. 4874-4882, 2016.

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.

ALFONSO-LOECHES, S. et al. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, 2014.

ÁLVAREZ-ERRICO, D.; SAYÓS, J.; LÓPEZ-BOTET, M. The IREM-1 (CD300f) inhibitory receptor associates with the p85 $\alpha$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. **The journal of immunology**, v. 178, n. 2, p. 808-816, 2007.

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

ANISMAN, H; MERALI, Z. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. In: Cytokines, stress, and depression. **Springer US**, 1999. p. 199-233.

AREND, W.P. et al. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annual Review Of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 27-55, 1998.

ASHCROFT, F. M. KATP channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochemical society transactions**, v. 34, p. 243-246, 2006.

ATZORI, M. et al. Locus coeruleus norepinephrine release: a central regulator of CNS spatio-temporal activation?. **Frontiers in synaptic neuroscience**, v. 8, p. 25, 2016.

BAN, M. et al. A non-synonymous SNP within membrane metalloendopeptidase-like 1 (MMEL1) is associated with multiple sclerosis. **Genes and immunity**, v. 11, n. 8, p. 660, 2010.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **The lancet**, v. 373, n. 9678, p. 1905-1917, 2009.

BAUERNFEIND, F. et al. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. **The journal of immunology**, v. 189, n. 8, p. 4175-4181, 2012.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine. **Journal of immunology**, v. 183, n. 2, p. 787-791, 2009.

BELTRAND, J. et al. Sulfonylurea therapy benefits neurological and psychomotor functions in patients with neonatal diabetes owing to

potassium channel mutations. **Diabetes care**, v. 38, n. 11, p. 2033-2041, 2015.

BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major depression. **Medical clinics**, v. 98, n. 5, p. 981-1005, 2014.

BERNARD, C. **An Introduction to the Study of Experimental Medicine**. U.S.A.: Schuman; 1865.

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Pleasure systems in the brain. **Neuron**, v. 86, n. 3, p. 646-664, 2015.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306, 2006.

BOEHM, T.; SWANN, J. B. Origin and evolution of adaptive immunity. **Annual review of animal biosciences**, v. 2, n. 1, p. 259-283, 2014.

BORREGO, F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 1951-1960, 2013.

BUCHMANN, K. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

BUSILLO, J. M.; AZZAM, K. M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. **Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38703-38713, 2011.

BYERS, S. L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35538, 2012.

CALIGIONI, C. S. Assessing reproductive status/stages in mice. **Current protocols in neuroscience**, p. A. 4I. 1-A. 4I. 8, 2009.

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



CARSON, M. J. et al. CNS immune privilege: hiding in plain sight. **Immunological reviews**, v. 213, n. 1, p. 48-65, 2006.

CASPI, A.; MOFFITT, T. E. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 583, 2006.

CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 6, p. 241–246, 2005.

CHAUVET-GELINIER, J. C.; BONIN, B. Stress, anxiety and depression in heart disease patients: A major challenge for cardiac rehabilitation. **Annals of physical and rehabilitation medicine**, v. 60, n. 1, p. 6-12, 2017.

CHEN, S. et al. Association of depression with pre-diabetes, undiagnosed diabetes, and previously diagnosed diabetes: a meta-analysis. **Endocrine**, v. 53, n. 1, p. 35-46, 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.

CHEN, Y. et al. The role of cytokines in the peripheral blood of major depressive patients. **Clinical laboratory**, v. 63, n. 7, p. 1207, 2017.

CHOI, A. J. S; RYTER, S. W. Inflammasomes: molecular regulation and implications for metabolic and cognitive diseases. **Molecules and cells**, v. 37, n. 6, p. 441, 2014.

CHOI, S. et al. Cutting edge: mouse cd300f (CMRF-35–Like Molecule-1) recognizes outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. **The journal of immunology**, v. 187, n. 7, p. 3483-3487, 2011.

CHOURBAJI, S, et al. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. **Neurobiology of disease**, v. 23, n. 3, p. 587-594, 2006.

CHROUSOS, G. P. et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance/hypensensitivity. potential clinical implications. **American journal of respiratory and critical medicine**, v. 154, p. S39-43, 1996.

CHUNG, D. et al. CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation. **The journal of immunology**, v. 171, n. 12, p. 6541-6548, 2003.

CLARK, G. J. et al. The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. **Trends in immunology**, v. 30, n. 5, p. 209-217, 2009.

CLARK, G. J. et al. The gene encoding the immunoregulatory signaling molecule CMRF-35A localized to human chromosome 17 in close proximity to other members of the CMRF-35 family. **HLA**, v. 57, n. 5, p. 415-423, 2001.

COHEN, S. et al. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 109, n. 16, p. 5995-5999, 2012.

COHEN, S. J.; STACKMAN, J. R. R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behavioural brain research**, v. 285, p. 105-117, 2015.

COHEN, S.; KESSLER R. C.; GORDON, L. U. Strategies for measuring stress in studies of psychiatric and physical disorders. In: COHEN, S.; KESSLER R. C.; GORDON, L. U. (Org). **Measuring stress: A guide for health and social scientists**, New Youk: Oxford, 1995. p. 3-26.

CORYELL, W. H. Clinical assessment of suicide risk in depressive disorder. **CNS spectrums**, v. 11, n. 6, p. 455-461, 2006.

COWEN, P. J. Cortisol, serotonin and depression: all stressed out?. **The british journal of psychiatry: the journal of mental science**, v.180, p. 99-100, 2002.

CRANE, G. E. Iproniazid (marsilid) phosphate, a therapeutic agent for mental disorders and debilitating diseases. **Psychiatric Research Reports**, v. 8, p. 142-152, 1957.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

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

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.

DANIELS, W. M. U. et al. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 17 glucocorticoid receptor promoter region. **Metabolic brain disease**, v. 24, n. 4, p. 615, 2009.

DANIK, J. S. et al. Novel loci, including those related to Crohn disease, psoriasis, and inflammation, identified in a genome-wide association study of fibrinogen in 17 686 women. *Circulation*: **Cardiovascular genetics**, v. 2, n. 2, p. 134-141, 2009.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46, 2008.

DER-AVAKIAN, A., MARKOU, A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 68-77, 2012.

DE RIVERO VACCARI, J. P.; DIETRICH, W. D.; KEANE, R. W. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. **Journal of cerebral blood flow & metabolism**, v. 34, n. 3, p. 369-375, 2014.

DE VOS, S. et al. Decomposing the heterogeneity of depression at the person-, symptom-, and time-level: latent variable models versus multimode principal component analysis. **BMC medical research methodology**, v. 15, n. 1, p. 88, 2015.

DEACON, R. M. Digging and marble burying in mice: simple methods in vivo identification of biological impact. **Nature protocols**, v. 1, p. 122-24, 2006.

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

DE BENEDETTO, G. E. et al. A rapid and simple method for the determination of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 98, p. 266-270, 2014.

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, 2012.

DIWAN, V.; GOBE, G.; BROWN, L. Glibenclamide improves kidney and heart structure and function in the adenine-diet model of chronic kidney disease. **Pharmacological research**, v. 79, p. 104-110, 2014.

DOOLIN, K. et al. Altered tryptophan catabolite concentrations in major depressive disorder and associated changes in hippocampal subfield volumes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 95, p. 8-17, 2018.

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

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, 2016.

EISENBERGER, N. I. et al. Inflammation-induced anhedonia: endotoxin reduces ventral striatum responses to reward. **Biological psychiatry**, v. 68, n. 8, p. 748-754, 2010.

ELOVAINIO, M. et al. Depression and C-reactive protein: population-based Health 2000 Study. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, n. 4, p. 423-430, 2009.

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.

FLESHNER, M.; FRANK, M.; MAIER, S. F. Danger signals and inflammasomes: stress-evoked sterile inflammation in mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, p. 36-45, 2016.

FORD, D.E., ERLINGER, T. P. Depression and C-reactive protein in US adults: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Archives of internal medicine**, v. 164, n. 9, p. 1010-1014, 2004.

FOSTICK, L. et al. The economic impact of depression: resistance or severity?. **European neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 10, p. 671-675, 2010.

FRANK, M. G. et al. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory 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.

FREDRICKSON, B. L. et al. Psychological well-being and the human conserved transcriptional response to adversity. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121839, 2015.

FOSTICK, L. et al. The economic impact of depression: resistance or severity?. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 10, p. 671-675, 2010.

GAINEY, 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.

GÁRATE, I. et al. Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 151, 2011.

GÁRATE, I. et al. Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 8, 2014.

GAZAL, M. et al. Association of interleukin-10 levels with age of onset and duration of illness in patients with major depressive disorder. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 37, n. 4, p. 296-302, 2015.

GOLDSMITH, D. R.; RAPAPORT, M. H.; MILLER, B. J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 12, p. 1696-1709, 2016.

GOLDSTEIN, B. I. et al. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 70, n. 8, p. 1078-1090, 2009.

GREENBERG, P. E. et al. The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000?. **Journal of clinical psychiatry**, v. 64, n. 12, p. 1465-1475, 2003.

GURUNG, P.; LUKENS, J. R.; KANNEGANTI, T. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. **Trends in molecular medicine**, v. 21, n. 3, p. 193-201, 2015.

GURURAJAN, A. et al. Molecular biomarkers of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 101-133, 2016.

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$ . **Nature immunology**, v. 9, n. 8, p. 857-865, 2008.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annual review of clinical psychology**, v. 1, p. 293-319, 2005.

HANAMSAGAR, R.; HANKE, M. L.; KIELIAN, T. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. **Trends in immunology**, v. 33, n. 7, p. 333-342, 2012.

HARIJITH, A.; EBENEZER, D. L.; NATARAJAN, V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

HARRIS, R. B. S. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models?. **American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 308, n. 4, p. R250-R265, 2015.

HARRISON, F. An introduction to the study of experimental medicine. **Bulletin of the medical library association**, v. 39, n. 3, p. 239, 1951.

HAY, S. I. et al. The burden of mental disorders in the Eastern Mediterranean region, 1990–2015: findings from the Global Burden of Disease 2015 Study. **International journal of public health**, v.63, p. 25-37, 2018

HAYLEY, S. Toward an anti-inflammatory strategy for depression. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 5, 2011.

HAYS, R. D. et al. Functioning and well-being outcomes of patients with depression compared with chronic general medical illnesses. **Archives of general psychiatry**, v. 52, n. 1, p. 11-19, 1995.

HENRIKSBO, B. D. et al. Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance. **Diabetes**, v. 63, n. 11, p. 3742-3747, 2014.

HENRY, C. J. et al. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 $\beta$  and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, n. 3, p. 309-317, 2009.

HERISSON, F. et al. Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration. **Nature neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 1209, 2018.

HILL, M. N. et al. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 36, n. 9, p. 2085-2117, 2012.

HITOMI, Y. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 124, n. 4, p. 779-785. e6, 2009.

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.

HODES, G. E. et al. Neuroimmune mechanisms of depression. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1386, 2015.

HODES, G. E., MENARD, C., RUSSO, S.J. Integrating Interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. **Neurobiology of stress**, v. 4, p. 15-22, 2016.

HOLSEN, L. M. et al. HPA-axis hormone modulation of stress response circuitry activity in women with remitted major depression. **Neuroscience**, v. 250, p. 733-742, 2013.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature immunology**, v. 9, n. 8, p. 847-856, 2008.

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, 2009.

HUANG, T., LEE, C. T-helper 1/T-helper 2 cytokine imbalance and clinical phenotypes of acute-phase major depression. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 61, n. 4, p. 415-420, 2007.



HUGHES, F. M. et al. Inflammasomes are important mediators of cyclophosphamide-induced bladder inflammation. **American journal of physiology-renal physiology**, v. 306, n. 3, p. F299-F308, 2014.

INSEL, T. et al. Research domain criteria (RDoC): toward a new classification framework for research on mental disorders. **American Journal of Psychiatry**, v.167, p.748-51, 2010.

IWATA, M. et al. Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor. **Biological psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 12-22, 2016.

IWATA, M., OTA, K. T., DUMAN, R. S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, behavior, and immunity**, v. 31, p. 105-114, 2013.

IZAWA, K. et al. Sphingomyelin and ceramide are physiological ligands for human LMIR3/CD300f, inhibiting FcεRI-mediated mast cell activation. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 133, n. 1, p. 270-273. e7, 2014.

IZAWA, K. et al. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 827-839, 2012.

JEON, S. A. et al. NLRP3 Inflammasome Contributes to Lipopolysaccharide-induced Depressive-Like Behaviors via Indoleamine 2,3-dioxygenase Induction. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 11, p. 896-906, 2017.

JOËLS, M. et al. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**, v. 7, n. 4, p. 221-231, 2004.

JOSEPH, J. J.; GOLDEN, S. H. Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1391, n. 1, p. 20-34, 2017.

JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy & behavior**, v. 38, p. 148-159, 2014.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J. Overlap between atypical depression, seasonal affective disorder and chronic fatigue syndrome. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 29, p. s19-s26, 2007.

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

KAESTNER, F. et al. Different activation patterns of proinflammatory cytokines in melancholic and non-melancholic major depression are associated with HPA axis activity. **Journal of affective disorders**, v. 87, n. 2, p. 305-311, 2005.

KAHL, K. G.; WESTHOFF-BLECK, M.; KRÜGER, T. H. C. Effects of psychopharmacological treatment with antidepressants on the vascular system. **Vascular pharmacology**, v. 96, p. 11-18, 2017.

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. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419-426, 2012.

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.

KÉRI, S.; SZABÓ, C.; KELEMEN, O. Expression of Toll-Like Receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder. **Brain, behavior, and immunity**, v. 40, p. 235-243, 2014.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The epidemiology of depression across cultures. **Annual review of public health**, v. 34, p. 119-138, 2013.

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

KIM, E. et al. CD300a and CD300f differentially regulate the MyD88 and TRIF-mediated TLR signalling pathways through activation of SHP-1 and/or SHP-2 in human monocytic cell lines. **Immunology**, v. 135, n. 3, p. 226-235, 2012.

KINGSBURY, M. et al. Stressful life events during pregnancy and offspring depression: evidence from a prospective cohort study. **Journal of the american academy of child & adolescent psychiatry**, v. 55, n. 8, p. 709-716. e2, 2016.

KÖHLER, C. A. et al. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 135, n. 5, p. 373-387, 2017.

KOKAI, M. et al. Plasma interleukin-18 levels in patients with psychiatric disorders. **Journal of immunotherapy**, v. 25, p. S68-S71, 2002.

KOO, J. W.; DUMAN, R. S. IL-1 $\beta$  is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 105, n. 2, p. 751-756, 2008.

KREINER, G. et al. Effects of the noradrenergic neurotoxin DSP-4 on the expression of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes after antidepressant treatment. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 6, p. 1349-1358, 2011.

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

KROES, R. A. et al. Modeling depression: social dominance–submission gene expression patterns in rat neocortex. **Neuroscience**, v. 137, n. 1, p. 37-49, 2006.

KRZYSZTON, C. P. et al. Exacerbated fatigue and motor deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral immune stimulation. **American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 295, n. 4, p. R1109-R1114, 2008.

KUBERA, M. et al. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subjected to the chronic mild stress model of depression. **Journal of affective disorders**, v. 63, n. 1, p. 171-178, 2001.

KUNZ, M. et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro-and anti-inflammatory balance. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 33, n. 3, p. 268-274, 2011.

KUPFERBERG, A.; BICKS, L.; HASLER, G. Social functioning in major depressive disorder. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 69, p. 313-332, 2016.

LABAR, K. S. Beyond fear: Emotional memory mechanisms in the human brain. **Current directions in psychological science**, v. 16, n. 4, p. 173-177, 2007.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER J. J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAMERS, F. et al. Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 692, 2013.

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

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, p. 137-161, 2012.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-1022, 2014.

LAMPRON, A.; ELALI, A.; RIVEST, S. Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. **Neuron**, v. 78, n. 2, p. 214-232, 2013.

LANQUILLON, S. et al. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 4, p. 370, 2000.

LAUMET, G. et al. Resolution of inflammation-induced depression requires T lymphocytes and endogenous brain interleukin-10 signaling. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 13, p. 2597, 2018.

LAURSEN, T. M. et al. Mortality and life expectancy in persons with severe unipolar depression. **Journal of affective disorders**, v. 193, p. 203-207, 2016.

LECHTENBERG, B. C.; MACE, P. D.; RIEDL, S. J. Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling. **Current opinion in structural biology**, v. 29, p. 17-25, 2014.

LEE, S. et al. CD300F blocks both MyD88 and TRIF-mediated TLR signaling through activation of Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1. **The journal of immunology**, v. 186, n. 11, p. 6296-6303, 2011.

LEE, S.; SUK, K.; LEE, W. Synthetic peptides containing ITIM-like sequences of IREM-1 (CD300F) differentially regulate MyD88 and TRIF-mediated TLR signalling through activation of SHP and/or PI3K. **Clinical & experimental immunology**, v. 167, n. 3, p. 438-446, 2012.

LEE, Y. H.; BAE, S. C. Association between functional NLRP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. **Lupus**, v. 25, n. 14, p. 1558-1566, 2016.

LEUSSIS, M. P.; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 30, n. 7, p. 1045-1064, 2006.

LEVINE, J. et al. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. **Neuropsychobiology**, v. 40, n. 4, p. 171-176, 1999.

LI, M.; D'ARCY, C.; MENG, X. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. **Psychological medicine**, v. 46, n. 4, p. 717-730, 2016.

LI, S. et al. Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. **Life sciences**, v. 82, n. 17, p. 934-942, 2008.

LIAO, J. et al. The NLRP3 inflammasome is critically involved in the development of bronchopulmonary dysplasia. **Nature communications**, v. 6, p. 8977, 2015.

LIMA, T. Z. et al. Astrocytic expression of the immunoreceptor cd300f protects hippocampal neurons from amyloid- $\beta$  oligomer toxicity in vitro. **Current alzheimer research**, v. 14, n. 7, 778-783, 2017.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LIU, J.; BUISMAN-PIJLMAN, F.; HUTCHINSON, M. R. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, 2014.

LIU, X. et al. Effects of group housing on stress induced emotional and neuroendocrine alterations. **Brain research**, v. 1502, p. 71-80, 2013.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>  $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-LÓPEZ, A. L. et al. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. **Physiology & behavior**, v. 161, p. 15-23, 2016.

LOPRESTI, Adrian L. et al. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 102-111, 2014.

LOTRICH, F. Inflammatory cytokines, growth factors, and depression. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 36, p. 5920-5935, 2012.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatics. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337, 2015.

LOUVEAU, A.; HARRIS, T. H.; KIPNIS, J. Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. **Trends in immunology**, v. 36, n. 10, p. 569-577, 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MADRIGAL, M. et al. Stress-induced oxidative changes in brain. **CNS & neurological disorders-drug**, v. 5, n. 5, p. 561-568, 2006.

MAES, M. et al. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. **BMC medicine**, v. 10, n. 1, p. 66, 2012.

MAES, M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 11-38, 1995.

MALATYNSKA, E. et al. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: implications for modeling elderly depression. **Experimental gerontology**, v. 47, n. 8, p. 552-564, 2012.

MARAZZITI, D. et al. Metabolic syndrome and major depression. **CNS spectrums**, v. 19, n. 4, p. 293-304, 2014.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228, 2006.

MARTÍNEZ-BARRIOCANAL, Á. et al. CD300 heterocomplexes, a new and family-restricted mechanism for myeloid cell signaling regulation. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 53, p. 41781-41794, 2010.

MARTÍNEZ-BARRIOCANAL, Á. et al. Effect of specific mutations in Cd300 complexes formation; potential implication of Cd300f in multiple sclerosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13544, 2017.

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237, 2006.

MATSUKAWA, T. et al. Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation. **Gut**, p. gutjnl-2014-308900, 2015.

MAVRIDES, N.; NEMEROFF, C. B. Treatment of affective disorders in cardiac disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 127, 2015.

MAYER, E. A. et al. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. **Journal of neuroscience**, v. 34, n. 46, p. 15490-15496, 2014.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain research**, v. 886, n. 1, p. 172-189, 2000.

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

MENARD, C. et al. Immune and neuroendocrine mechanisms of stress vulnerability and resilience. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 62, 2017.

MESQUITA, A. R. et al. IL-10 modulates depressive-like behavior. **Journal of psychiatric research**, v. 43, n. 2, p. 89-97, 2008.

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.

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.



MINKIEWICZ, J.; RIVERO VACCARI, J. P.; KEANE, R. W. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. **Glia**, v. 61, n. 7, p. 1113-1121, 2013.

MITRA, Rupshi et al. Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. **Neuroscience letters**, v. 383, n. 3, p. 278-283, 2005.

MONROE, S. M.; SLAVICH, G. M.; GEORGIADES, K. The social environment and life stress in depression. In I. H. Gotlib; C. L. Hammen (Org). **Handbook of depression**, New York: Guilford Press, 2009, 2nd ed, p. 340-360.

MOON, M. L. et al. IL-4 knock out mice display anxiety-like behavior. **Behavior genetics**, v. 45, n. 4, p. 451-460, 2015.

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.

MOSHKOVITS, I. et al. CD300f associates with IL-4 receptor  $\alpha$  and amplifies IL-4-induced immune cell responses. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 112, n. 28, p. 8708-8713, 2015.

MORET, C., BRILEY, M. The importance of norepinephrine in depression. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 7, n. Suppl 1, p. 9, 2011.

MOTA, R. et al. Interleukin-1 $\beta$  is associated with depressive episode in major depression but not in bipolar disorder. **Journal of psychiatric research**, v. 47, n. 12, p. 2011-2014, 2013.

MUNKHOLM, K.; VINBERG, M.; KESSING, L. V. Cytokines in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. **Journal of affective disorders**, v. 144, n. 1, p. 16-27, 2013.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

MURRAY, C. J. L et al. Evidence-based health policy-lessons from the global burden of disease study. **Science**, v. 274, n. 5288, p. 740-743, 1996.

NAIR, R. P. et al. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 8, p. 1349-1356, 1997.

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.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **Journal of psychiatric research**, v. 41, n. 3, p. 189-206, 2007.

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.

OGŁODEK, E. A. The role of pon-1, gr, il-18, and oxldl in depression with and without posttraumatic stress disorder. **Pharmacological reports**, v. 69, n. 5, p. 837-845, 2017.

OH, K.Y. et al. Effects of chronic physical disease and systemic inflammation on suicide risk in patients with depression: a hospital-based case-control study. *Psychological medicine*, p. 1-9, 2019.

ONYIKE, C. U. et al. Is obesity associated with major depression? Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **American journal of epidemiology**, v. 158, n. 12, p. 1139-1147, 2003.

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

OWEN, B. M. et al. Raised levels of plasma interleukin-1 $\beta$  in major and postviral depression. **Acta psychiatrica scandinavica**, v. 103, n. 3, p. 226-228, 2001.

PACE, T. W. W.; MILLER, A. H. Cytokines and glucocorticoid receptor signaling. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1179, n. 1, p. 86-105, 2009.

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.

PANDEY, G. N. Inflammatory and innate immune markers of neuroprogression in depressed and teenage suicide brain. In: **Neuroprogression in Psychiatric Disorders**. Karger Publishers, p. 79-95, 2017.

PAPAKOSTAS, G. I. et al. Quality of life assessments in major depressive disorder: a review of the literature. **General hospital psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 13-17, 2004.

PASS, L.; LEJUEZ, C. W.; REYNOLDS, S. Brief behavioural activation (brief ba) for adolescent depression: a pilot study. **Behavioural and cognitive psychotherapy**, p. 1-13, 2017.

PATTEN, S. B. et al. Patterns of association of chronic medical conditions and major depression. **Epidemiology and psychiatric sciences**, p. 1-9, 2016.

PELUFFO, H. et al. CD300f immunoreceptor contributes to peripheral nerve regeneration by the modulation of macrophage inflammatory phenotype. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 145, 2015.

PELUFFO, H. et al. Overexpression of the immunoreceptor CD300f has a neuroprotective role in a model of acute brain injury. **Brain pathology**, v. 22, n. 3, p. 318-328, 2012.

PENNINX, B. W. J. H. et al. Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile. **BMC medicine**, v. 11, n. 1, p. 129, 2013.

PEREZ-CABALLERO, L. et al. Monoaminergic system and depression. **Cell and Tissue Research**, p. 1-7, 2019.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001

PLIEGER, T. et al. Life stress as a potential risk factor for depression and burnout. **Burnout research**, v. 2, n. 1, p. 19-24, 2015.

POPOVIĆ, N.; CABALLERO-BLEDA, M.; POPOVIĆ, M. Post-training scopolamine treatment induced maladaptive behavior in open field habituation task in rats. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100348, 2014.

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.

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.

PROELL, M. et al. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. **Biochemical journal**, v. 449, n. 3, p. 613-621, 2013.

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

RAMESH, G.; MACLEAN, A. G.; PHILIPP, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

RÉUS, G. Z. et al. Resilience dysregulation in major depressive disorder: focus on glutamatergic imbalance and microglial activation. **Current neuropharmacology**, 2017.

RHEINHEIMER, J. et al. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: a systematic review. **Metabolism**, v. 74, p. 1-9, 2017.

ROBERTS, R. L. et al. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. **Atherosclerosis**, v. 218, n. 1, p. 123-126, 2011.

RODRIGUES, A. L. et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology & toxicology**, v. 79, n. 3, p. 150-6, 1996.

ROQUE, A.; OCHOA-ZARZOSA, A.; TORNER, L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. **Brain, behavior, and immunity**, v. 55, p. 39-48, 2016.

ROQUE, S. et al. Interleukin-10: a key cytokine in depression?. **Cardiovascular psychiatry and neurology**, v. 2009, 2009.

ROSA, P. B. et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 127, p. 1-6, 2014.

SALLEH, M. R. Life event, stress and illness. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 15, n. 4, p. 9, 2008.

SATO, H. et al. Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 47, n. 3, p. 224-232, 2010.

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, 2005.

SCHNEIDERMAN, N.; IRONSON, G.; SIEGEL, S. D. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. **Annual reviews of clinical psychology**, v. 1, p. 607-628, 2005.

SCHOULTZ, I. et al. Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedish men. **The american journal of gastroenterology**, v. 104, n. 5, p. 1180, 2009.

SCHUCH, J. J. J. et al. Gender differences in major depressive disorder: results from the Netherlands study of depression and anxiety. **Journal of affective disorders**, v. 156, p. 156-163, 2014.

Scully, C. Immunity, inflammatory disorders, immunosuppressive and anti-inflammatory agents. **Scully's Medical Problems in Dentistry**, p. 481-497, 2014.

SELYE, H. **The Stress of Life**. New York: McGraw-Hill, 1956.

SEKI, K., YOSHIDA, S., JAISWAL, M. K. Molecular mechanism of noradrenaline during the stress-induced major depressive disorder. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 7, p. 1159, 2018.

SENEY, M. L. et al. Opposite molecular signatures of depression in men and women. **Biological psychiatry**, 2018.

SHIBA, E. et al. Ceramide-CD300f binding inhibits lipopolysaccharide-induced skin inflammation. **Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 7, p. 2924-2932, 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.

SLAVICH, G. M.; IRWIN, M. R. From stress to inflammation and major depressive disorder: A social signal transduction theory of depression. **Psychological bulletin**, v. 140, n. 3, p. 774, 2014.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Medical hypotheses**, v. 35, n. 4, p. 298-306, 1991.

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.

SÖDERLUND, J. et al. Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-1 $\beta$  in bipolar disorder. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 36, n. 2, p. 114, 2011.

SOUSA, F.S.S et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like, anxiogenic-like and hyperalgesic behavior is attenuated by acute administration of  $\alpha$ -(phenylselanyl) acetophenone in mice. **Neuropharmacology**, v. 146, p. 128-137, 2019.

STERU, L. et al. The tail suspension test - a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STRAWBRIDGE, R. et al. Inflammation and clinical response to treatment in depression: a meta-analysis. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1532-1543, 2015.

STROUD, C. B.; DAVILA, J.; MOYER, A. The relationship between stress and depression in first onsets versus recurrences: A meta-analytic review. **Journal of abnormal psychology**, v. 117, n. 1, p. 206, 2008.

SU, W. J. et al. Antidiabetic drug glyburide modulates depressive-like behavior comorbid with insulin resistance. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 210, 2017.

SU, W.J. et al. NLRP3 gene knockout blocks NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model. **Behavioural brain research**, v. 322, p. 1-8, 2017.

SYED, S. A. et al. Defective inflammatory pathways in never-treated depressed patients are associated with poor treatment response. **Neuron**, v. 99, n. 5, p. 914-924. e3, 2018.

TANAKA, M. et al. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. **European journal of pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 397-406, 2000.

TANIGUTI, E. H. et al. Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Physiology & behavior**, v. 188, p. 270-275, 2018.

TAFET, G. E. et al. Correlation between cortisol level and serotonin uptake in patients with chronic stress and depression. **Cognitive, affective, & behavioral neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 388-393, 2001.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 335-376, 2003.

TAKESHITA, Y.; RANSOHOFF, R. M. Inflammatory cell trafficking across the blood–brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. **Immunological reviews**, v. 248, n. 1, p. 228-239, 2012.

TAN, M. et al. NLRP3 polymorphisms are associated with late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese. **Journal of neuroimmunology**, v. 265, n. 1, p. 91-95, 2013.

TIAN, L. et al. p85 $\alpha$  recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. **Nature communications**, v. 5, p. 3146, 2014.

TOSUN, C. et al. Inhibition of the Sur1-Trpm4 channel reduces neuroinflammation and cognitive impairment in subarachnoid hemorrhage. **Stroke**, v. 44, n. 12, p. 3522-3528, 2013.

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

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et biophysica acta (bba)-molecular cell research**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397, 2009.

VAN AGTMAAL, M. J. M et al. Association of microvascular dysfunction with late-life depression: a systematic review and meta-analysis. **JAMA psychiatry**, v. 74, n. 7, p. 729-739, 2017.

VARGHESE, F. P.; BROWN, E. S. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in major depressive disorder: a brief primer for primary care



physicians. **Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry**, v. 3, n. 4, p. 151, 2001.

VERMA, D. et al. Gene polymorphisms in the NALP3 inflammasome are associated with interleukin-1 production and severe inflammation: Relation to common inflammatory diseases?. **Arthritis & rheumatology**, v. 58, n. 3, p. 888-894, 2008.

VETTER, M. L. et al. Gender differences in the relationship between symptoms of depression and high-sensitivity CRP. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. S1, p. S38, 2013.

VIEIRA, J. O. et al. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 81, p. 426-437, 2018.

VITALLÉ, J. et al. CD300 receptor family in viral infections. **European journal of immunology**, 2018.

VOS, T. et al. Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743-800, 2015.

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

WALKER, D. J.; SPENCER, K. A. Glucocorticoid programming of neuroimmune function. **General and comparative endocrinology**, v. 256, p. 80-88, 2018.

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

WANG, S. et al. Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. **Genetics and molecular research**, v. 14, p. 17447-17452, 2015.

WANG, Y. et al. Simultaneous determination of seven neuroactive steroids associated with depression in rat plasma and brain by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical sciences**, v. 32, n. 9, p. 981-988, 2016.

WICKENS, R. A. et al. Repeated daily administration of increasing doses of lipopolysaccharide provides a model of sustained inflammation-induced depressive-like behaviour in mice that is independent of the NLRP3 inflammasome. **Behavioural brain research**, v. 352, p. 99-108, 2018.

WIĘDŁOCHA, M. et al. Effect of antidepressant treatment on peripheral inflammation markers—A meta-analysis. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 80, p. 217-226, 2018.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of stress**, v. 6, p. 78-93, 2017.

WOHLEB, E. S. et al. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. **Nature reviews neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 497-511, 2016.

WOHLEB, E. S. et al. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 497, 2016.

WOHLEB, E. S. et al. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, 2014.

WOHLEB, E. S. et al. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 34, p. 13820-13833, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Depression and other common mental disorders: global health estimates. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

XI, H. et al. Negative regulation of autoimmune demyelination by the inhibitory receptor CLM-1. **Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 1, p. 7-16, 2010.

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.

YAN, Y. et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p. 62-73, 2015.

YANG, L. et al. The serum interleukin-18 is a potential marker for development of post-stroke depression. **Neurological research**, v. 32, n. 4, p. 340-346, 2010.

YANG, S. et al. Antidepressant-like effects of salidroside on olfactory bulbectomy-induced pro-inflammatory cytokine production and hyperactivity of HPA axis in rats. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 124, p. 451-457, 2014.

YIRMIYA, R.; RIMMERMAN, N.; RESHEF, R. Depression as a microglial disease. **Trends in neurosciences**, v. 38, n. 10, p. 637-658, 2015.

YOUNG, E. A.; KWAK, S. P.; KOTTAK, J. Negative feedback regulation following administration of chronic exogenous corticosterone. **Journal of neuroendocrinology**, v. 7, n. 1, p. 37-45, 1995.

ZHANG, G. et al. A protective role of glibenclamide in inflammation-associated injury. **Mediators of inflammation**, v. 2017, p. 3578702, 2017.

ZHANG, H. et al. NLRP3 gene is associated with ulcerative colitis (uc), but not crohn's disease (cd), in chinese han population. **Inflammation research**, v. 63, n. 12, p. 979-985, 2014.

ZHANG, J. C. et al. Blockade of interleukin-6 receptor in the periphery promotes rapid and sustained antidepressant actions: a possible role of

gut–microbiota–brain axis. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 5, p. e1138, 2017.

ZHANG, L. et al. Association of NLRP3 gene single nucleotide polymorphisms with metabolic syndrome. **Chinese journal of medical genetics**, v. 33, n. 4, p. 530-534, 2016.

ZHANG, W. et al. Cardiac fibroblasts contribute to myocardial dysfunction in mice with sepsis: the role of NLRP3 inflammasome activation. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107639, 2014.

ZHANG, W. 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**, v. 67, p. 138-144, 2019.

ZHANG, Y. et al. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 119-124, 2014.

ZHOU, D. et al. The NLRP3 rs10754558 polymorphism is associated with the occurrence and prognosis of coronary artery disease in the chinese han population. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

ZHOU, D. et al. The NLRP3 rs10754558 polymorphism is associated with the occurrence and prognosis of coronary artery disease in the Chinese Han population. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

ZHU, Z. et al. A polymorphism within the 3' utr of nlrp3 is associated with susceptibility for ischemic stroke in chinese population. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 36, n. 6, p. 981-988, 2016.

ZORN, J. V. et al. Cortisol stress reactivity across psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 77, p. 25-36, 2017.