

Nicolle Platt dos Santos

**O BLOQUEIO DOS RECEPTORES P2X7 NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS PELO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO**

Florianópolis

2017



Nicolle Platt dos Santos

**O BLOQUEIO DOS RECEPTORES P2X7 NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS PELO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Manuella Pinto Kaster

Co-orientadora: Dr. Ana Belén Ramos Hryb

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

dos Santos, Nicolle Platt

O BLOQUEIO DOS RECEPTORES P2X7 NOS EFEITOS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS PELO ESTRESSE DE
CONTENÇÃO / Nicolle Platt dos Santos ; orientador,
Manuella Pinto Kaster, coorientador, Ana Belén Ramos Hryb,
2017.

43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Estresse de contenção. 3.
Neuroinflamação. 4. Comportamento. 5. Receptores P2X7. I.
Kaster, Manuella Pinto. II. Hryb, Ana Belén Ramos. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

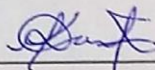
Nicolle Platt dos Santos

**O BLOQUEIO DOS RECEPTORES P2X7 NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS PELO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO**

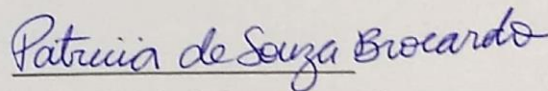
Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 30 de novembro de 2017.

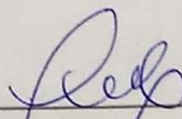
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Manuella Pinto Kaster
Presidente da banca - Orientadora



Prof. Dra. Patrícia de Sousa Brocardo
Universidade Federal de Santa Catarina



Dr. Filipe Marques Gonçalves
Albert Einstein College of Medicine

Dedico este trabalho à minha mãe, Simony, que sempre com muito carinho, dedicação e respeito, me apoiou e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer à minha família pelo incentivo e suporte desde sempre. Obrigada, mãe, pelas conversas inspiradoras sobre perícia criminal, antropologia forense, pelos livros, séries e filmes que relacionam a ciência que vimos juntas e discutimos. Com certeza você foi a pessoa que mais me influenciou a me interessar por biologia, e graças a você tive a garra e a vontade de passar por essa etapa. Você é uma inspiração para mim!

Obrigada, Sarah, minha irmã, pelo carinho, pelas conversas, e simplesmente pelo seu jeito de ser, que sempre me fez rir muito, deixando a vida de todos mais leve, principalmente em épocas que o estresse foi alto. Ao meu padrasto, Valci, que me acolheu como filha desde pequena e auxiliou muito na minha educação e crescimento pessoal.

Agradeço ao meu pai, Murilo, minha madrasta, Rose e minha irmã de coração, Mel. Que mesmo à distância, estiveram do meu lado me dando suporte e carinho. Obrigada pelo acolhimento tão amoroso que vocês me proporcionaram, eu sei que vocês se importam comigo e querem meu bem.

Ao meu namorado, Matheus, que esteve ao meu lado durante toda essa etapa de conclusão de curso, sempre sendo meu melhor amigo, meu ajudante de experimentos, meu professor de química e meu parceiro. Muito obrigada pelo carinho, incentivo, paciência.

Aos meus amigos de graduação, principalmente Pam, Claudia e Ana Wink que moram no meu coração e sou muito grata por terem entrado na minha vida. À Natani, que compartilhou comigo toda a experiência de estágio, mas que já está na minha vida muito antes da faculdade. Obrigada pela tua amizade, e por tudo que vivemos juntas nesse percurso.

Aos meus amigos “da vida“ Iel, Dri, Douglas, Gabi, Carla, Lucas que tenho o prazer de compartilhar experiências e alegrias há muitos anos. E os amigos que fiz durante esses anos dentro da UFSC (Thiago, Rômulo, Vic, Bruna e Dario).

À UFSC por me proporcionar o egresso e permanência em um curso de graduação de excelência e gratuito que me permitiu conhecer e conviver com pessoas excepcionais.

Ao pessoal do LAMEB, Denis, Vanessa e Camille, sempre queridos e solícitos.

Às meninas orientadas pelo professor Rodrigo: Isa, Ana e Ingrid, que me ajudaram muito com dicas, materiais emprestados e com a simpatia que emanam.

Ao laboratório vizinho, liderado pela prof Andreza, obrigada pelo convívio, conversas e auxílio.

Aos meus colegas de laboratório, que descontraem o ambiente de trabalho, me fazem rir e me ajudam tanto com dúvidas teóricas quanto práticas; em especial agradeço à Pri, que sempre está de muito boa vontade em ajudar a todos e me inspira muito; à Mauren, minha “gêmea

oposta” parceira de trabalho (dentro e fora do lab), de academia e de conversas. À Fê, minha roommate fofa, que sempre me ajuda muito também. À Ana Ramos, minha co-orientadora, que me ensinou a maior parte dos procedimentos e técnicas que conheço hoje, sempre com muita paciência e disponibilidade para tirar minhas dúvidas e me auxiliar com experimentos. Obrigada por todo aprendizado! À prof Ana Lúcia, que muito carinhosamente aceitou uma pessoa de fora em seu laboratório e permitiu o espaço e o suporte para realização de todos os experimentos.

E finalmente sou extremamente grata à Manu, minha orientadora, que primeiro me cativou como professora de Bioquímica, abrindo meus olhos para esse mundo micro que fiquei apaixonada. Posteriormente como orientadora, sempre excepcional, estando ao meu lado e me orientado com toda paciência e fofura do mundo. Obrigada pela oportunidade de trabalhar contigo, me espelho muito em você!

“Todos os problemas parecem infantis, depois de explicados”.

A volta de Sherlock Holmes. Arthur Conan Doyle, 1905.

“Para mim, é muito melhor compreender o Universo como ele realmente é do que persistir no engano, por mais satisfatório e tranquilizador que possa parecer”.

O mundo assombrado pelos demônios. Carl Sagan, 1996.

“It is imperfection - not perfection - that is the end result of the program written into that formidably complex engine that is the human brain, and of the influences exerted upon us by the environment and whoever takes care of us during the long years of our physical, psychological and intellectual development”.

In praise of imperfection. Rita Levi-Montalcini, 1988.

RESUMO

O ATP tem sido implicado na indução de processos inflamatórios agudos e crônicos. A ativação de receptores do subtipo P2X7 por altas concentrações de ATP ocorre durante estresse e dano celular. Estes receptores desempenham um papel fundamental no processamento e secreção da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β), via ativação do complexo do inflamassoma NLRP3. Nesse sentido, o presente projeto teve como objetivo avaliar o envolvimento dos receptores de ATP do subtipo P2X7 nas alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pelo modelo do estresse agudo de contenção. Os animais foram tratados com um antagonista de receptores P2X7, Brilliant Blue G (BBG, 50 mg/kg, i.p., uma vez ao dia por 7 dias) ou veículo. No sétimo dia, os animais foram submetidos ao modelo de estresse de contenção por 7h e quarenta minutos após o término do estresse os animais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação do comportamento tipo-depressivo e ansioso. Os níveis de IL-1 β foram mensurados no hipocampo e córtex pré-frontal, e o imunoconteúdo da TXNIP foi avaliado no hipocampo. Nossos resultados mostraram um efeito tipo-depressivo do estresse de contenção ao aumentar o tempo de imobilidade dos animais no Teste de Nado Forçado (TNF) quando comparado ao grupo controle, assim como apresentou um efeito tipo-ansioso visto através da diminuição do tempo de permanência dos animais nos braços abertos pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE) quando comparado ao grupo controle. O antagonista de receptores P2X7 (BBG) na dose de 50 mg/kg foi capaz de prevenir os efeitos do estresse reduzindo o tempo de imobilidade no TNF, mas não foi significativo em prevenir o efeito tipo-ansioso induzido pelo estresse no TLCE. Quanto aos parâmetros bioquímicos, o estresse de contenção reduziu os níveis de IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal. Contudo o tratamento com BBG causou uma reversão parcial nos níveis de IL-1 β em ambas estruturas. Além disso, o estresse de contenção aumentou significativamente o imunoconteúdo de TXNIP no hipocampo do grupo tratado com BBG e submetido ao estresse. Assim, nossos resultados sugerem que o bloqueio dos receptores P2X7 previne o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse agudo e que este efeito pode estar, pelo menos em parte, envolvido com a manutenção dos níveis de IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais.

Palavras-chave: estresse; ATP; P2X7; comportamento; inflamação

ABSTRACT

ATP has been implicated in the induction of acute and chronic inflammatory processes. The P2X7 receptors are activated by high concentrations of ATP, generally associated with stress or cellular damage. These receptors play a key role in the processing and release of pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) via the activation of the inflammatory complex NLRP3. In this way the present project aimed to evaluate the involvement of the P2X7 receptors in the neurochemical and behavioral alterations induced by acute restraint stress. The animals were treated with a P2X7 receptor antagonist, Brilliant Blue G (BBG, 50 mg/kg, i.p., once a day for 7 days) or vehicle. On the seventh day, the animals were submitted to the acute restraint stress for 7h and forty minutes after the end of the stress the animals were evaluated in the behavioral tests for depressive-like and anxiety-like behaviors. IL-1 β levels were measured in the hippocampus and prefrontal cortex, and the immunocontent of TXNIP was evaluated in the hippocampus. Our results showed a depressive-like effect of acute restraint stress, characterized by the increase in immobility time in the FST when compared to the control group. In addition, acute restraint stress was associated with an anxious-like effect characterized by the decrease in the amount of time spent in the open arms of the plus-maze when compared to group control. Treatment with the P2X7 receptor antagonist (BBG 50 mg/kg) was capable to prevent the depressive-like effect of stress in FST, but not the anxiogenic-like effect in the elevated plus-maze. Concerning the neurochemical parameters, acute restraint stress decreased levels of IL-1 β in the hippocampus and prefrontal cortex, an effect that was partially prevented by BBG treatment. Moreover, acute restraint stress increased the immunocontent of TXNIP in the hippocampus, an effect that was further increased in the group treated with BBG and submitted to stress. Thus, our results demonstrated that the blockade of P2X7 receptors might represent a good strategy to prevent the depressive-like behavior induced by acute stress, an effect that might be partially associated with the recovery of IL-1 β levels in the hippocampus and prefrontal cortex.

Keywords: stress, ATP; P2X7; behavior; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação do eixo HPA	17
Figura 2 - Ativação do complexo NLRP3 via ROS e efluxo de K ⁺	20
Figura 3 - Protocolo de tratamento	23
Figura 4 - Comportamento tipo-depressivo	29
Figura 5 - Comportamento tipo-ansioso	30
Figura 6 - Níveis de IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal	31
Figura 7 - Imunoreatividade de TXNIP no hipocampo	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrópico

ATP - Adenosina trifosfato

BBG - *Brilliant Blue G*

BSA - Albumina de soro bovino

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CRH - Hormônio liberador de corticotropina

DAMP - Padrão molecular associado ao dano

DO - Densidade óptica

ECI - Estresse crônico imprevisível

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERO - Espécies reativas de oxigênio

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

IL - Interleucina

IL-18 - Interleucina-18

IL-1 β - Interleucina-1 β

i.p. - Intraperitoneal

K⁺ - Íon potássio

LPS - Lipopolisacarídeo

NaCl - Cloreto de sódio

NaF - Fluoreto de sódio

Na₃VO₄ - Ortovanadato de sódio

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

PBS - Solução fosfato-salina

PMSF - Fluoreto de fenilmetasufonil

PVN - Núcleo paraventricular do hipotálamo

RG - Receptor de glicocorticóides

RM - Receptor de mineralocorticoides

SDS - Dodecil sulfato sódico

SI - Sistema Imunológico

TBS - Tampão TRIS-salina

TBS-T - Tampão TRIS-salina-Tween

TCA - Teste do campo aberto

TLCE - Teste do labirinto em cruz elevado

TNF - Teste de nado forçado

TRIS - Tris-hidroximetilaminometano

TRX - Tiorredoxina oxidoreductase

TXNIP - Proteína de interação com a tiorredoxina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O ESTRESSE	15
1.2 O ESTRESSE E A NEUROINFLAMAÇÃO	17
1.3 OS RECEPTORES P2X7 NA NEUROINFLAMAÇÃO	18
1.4 JUSTIFICATIVA	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 HIPÓTESES	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 ANIMAIS E TRATAMENTO	22
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	22
4.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	23
4.3.1 Teste do Campo Aberto (TCA)	24
4.3.2 Teste de Nado Forçado (TNF)	24
4.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE)	24
4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	25
4.4.1 Avaliação dos níveis de IL-1β	25
4.4.2 Avaliação do imunocontéudo de TXNIP	26
4.4.3 Dosagem de proteínas totais	27
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
5 RESULTADOS	28
5.1 COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO	28
5.2 COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO	29
5.3 NÍVEIS DE IL-1 β NO HIPOCAMPO CPF	30
5.4 IMUNOREATIVIDADE DE TXNIP NO HIPOCAMPO	32
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	37
8 REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ESTRESSE

As neuropatologias têm sido cada vez mais destacadas atualmente devido à alta taxa de recorrência em pacientes no mundo todo. Além do grande dispêndio econômico anual que geram, existe uma tendência a um aumento significativo destas doenças com o envelhecimento da população (ANDLIN-SOBOCKI et al., 2005). Sendo assim, a necessidade de recursos para a diminuição ou prevenção dos sintomas neurodegenerativos é imprescindível. As doenças que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC) são, em sua maioria, multifatoriais. Contudo, é notável a sua relação com o estresse, considerado um dos principais fatores ambientais no desencadeamento e sucessão de processos neurodegenerativos que ocorrem nestas patologias (VOLLMAYR; HENN 2003, LUCASSEN et al., 2006).

O estresse é um mecanismo adaptativo que desencadeia respostas fisiológicas necessárias ao organismo frente a uma perturbação, ameaça ou perigo. Dentre as respostas fisiológicas associadas ao estresse estão o aumento de pressão sanguínea, aumento de frequência cardíaca, mobilização de recursos energéticos, efeito anti-inflamatório e imunossupressor (BUSILLO; CIDLOWSKI, 2013), estado de hipervigilância, entre outros (FINSTERWALD; ALBERINI, 2015). Porém o estresse severo ou contínuo, pode causar prejuízos cognitivos (WILSON et al., 2007) promover o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (KIBEL; DRENJANCEVIC-PERIC, 2008) e desencadear ou agravar a progressão de sintomas psiquiátricos como alterações no humor, ansiedade e prejuízo cognitivo (VOLLMAYR; HENN 2003, BORROW et al., 2016).

O cortisol (glicocorticóide majoritário em humanos) e corticosterona (glicocorticóide majoritário em roedores) são hormônios esteróides produzidos e liberados pelas glândulas adrenais em situações de estresse. Estes hormônios atuam em diversos tecidos, preparando o organismo para uma resposta de “luta ou fuga” e exercendo uma influência anti-inflamatória e imunossupressora (BUSILLO; CIDLOWSLI, 2013). O eixo hipotálamo–pituitária–adrenal (HPA) é o eixo neuroendócrino responsável pelo controle da secreção dos hormônios glicocorticóides (GC) e também pela sua retro-inibição, processo responsável por cessar a resposta quando não há mais situação de perigo. Falhas no processo de retro-inibição podem causar um aumento sustentado nos níveis de GC circulantes e estão associadas a diversas consequências deletérias no SNC como prejuízos na neuroplasticidade e morte celular (VYAS et al., 2016).

A ativação do eixo HPA inicia com a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) através dos neurônios dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, estimulando assim a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária, que atingem a circulação sistêmica e estimulam a síntese e liberação de GC pelo córtex adrenal (**Figura 1**). Os GC atuam em diversos tecidos do organismo, mas devido à uma grande densidade de receptores de GC, o hipocampo é uma região particularmente sensível aos efeitos destes hormônios (FINSTERWALD; ALBERINI, 2014). Pode-se dizer que os eventos estressores são capazes de alterar a morfologia desta região, uma vez que a hipersecreção de GC está associada a uma redução na arborização dendrítica (SHELIN et al., 2003), diminuição da neurogênese no giro dentado do hipocampo (SAPOLSKY et al., 1990) e até mesmo uma atrofia hipocampal (LUPIEN et al., 1998). Além disso, o hipocampo é uma estrutura relacionada a processos cognitivos, de aprendizado, memória e regulação de humor, sendo sugerida uma correlação entre hiperativação do eixo HPA e déficits nestes comportamentos (LATHE, 2001). O excesso de GC é capaz de aumentar a neurotoxicidade por diferentes mecanismos, como por exemplo modificação no metabolismo da célula, excitotoxicidade, estresse oxidativo e disfunção da resposta imunológica (MADRIGAL et al., 2006, SATO et al., 2010).

Figura 1: Eixo neuroendócrino de resposta ao estresse.

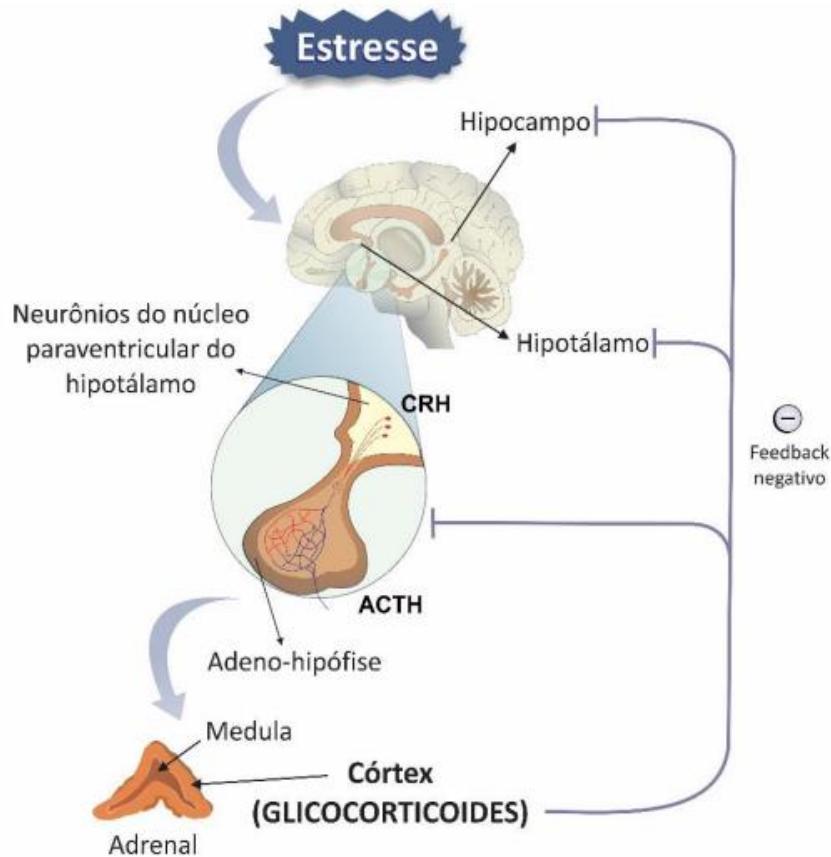


Figura 1: O estresse desencadeia respostas fisiológicas através da secreção de hormônio liberador de corticotropina (CRH) por neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo, que induzem a secreção do hormônio adrenocorticotrófico pela glândula pituitária (ou adeno-hipófise), e estimulam o córtex adrenal a produzir e secretar hormônios glicocorticóides (GC). Este eixo possui um sistema de retro-inibição, no qual concentrações elevadas de GC atuando em receptores de GC localizados no hipocampo, hipotálamo e pituitária, são capazes de inibir o processo. Figura adaptada de Neis, 2017.

1.2 O ESTRESSE E A NEUROINFLAMAÇÃO

As células da microglia, os astrócitos, oligodendrócitos, as células endoteliais da microvasculatura cerebral e até mesmo os neurônios são capazes de produzir e secretar citocinas inflamatórias (RAMESH et al., 2013). No SNC, as citocinas funcionam como neuromoduladores que atuam regulando a transmissão sináptica, a excitabilidade neuronal e a ativação do eixo HPA (RICHTER et al., 2017). 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; RANSOHOFF, 2012).

Um fator que contribui potencialmente para o efeito do estresse na progressão dos processos neurodegenerativos envolve a ativação do sistema imunológico (MILLER et al., 2009). O efeito do estresse sobre o sistema imunológico é complexo. Agudamente, a secreção de GC está associada a uma supressão da resposta imunológica e a um efeito anti-inflamatório bem estabelecido (CAIN; CIDLOWSKY, 2017). Contudo, estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que quando intenso ou crônico, o estresse pode gerar um aumento na produção de citocinas inflamatórias e no fenótipo pró-inflamatório de células imunes, associado à insensibilidade destas células frente aos efeitos anti-inflamatórios dos GC (BARNES; ADCOCK, 2009; CHROUSOS et al., 1996; COHEN et al., 2012).

1.3 OS RECEPTORES P2X7 NA NEUROINFLAMAÇÃO

O ATP é um nucleotídeo derivado da adenina que além da função energética, atua como um importante neurotransmissor excitatório no SNC (FRENGUELLI, 2017). O ATP pode atuar em receptores metabotrópicos purinérgicos P2Y, família com oito subtipos de receptores caracterizados, ou em receptores ionotrópicos purinérgicos P2X, família com sete subtipos P2X clonados e caracterizados. Entre eles, os receptores do subtipo P2X7 são receptores de baixa afinidade, ativados por concentrações de ATP entre 100-1000 μM , frequentemente associados a condições patológicas. A ativação dos receptores P2X7 está associada a um aumento no efluxo de K^+ e uma despolarização celular. A ativação destes receptores já foi relacionada a processos de excitotoxicidade e morte celular (BURNSTOCK, 2017). Os receptores P2X7 são abundantemente expressos na microglia, em menor extensão em astrócitos (YUE et al., 2017), oligodendrócitos e nos terminais pré-sinápticos de neurônios (SWAYNE; BOYCE, 2017).

O estresse está associado a um aumento na liberação de ATP no SNC, e o efluxo de K^+ causado pela ativação dos receptores P2X7 tem sido implicado na indução de processos inflamatórios (MARIATHASAN et al., 2006). Recentemente, estudos têm demonstrado que a depleção genética dos receptores P2X7 está associada a um comportamento tipo antidepressivo em modelos preditivos como o teste de suspensão pela cauda (CSOLLE et al., 2013). Além disso, a administração sub-crônica de um antagonista de receptores P2X7 foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo e a liberação de citocinas pró-inflamatórias em um modelo de depressão induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) (MA et al., 2014), e paralelamente, em um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) (LI et al., 2016,

CLARKE et al., 2017), sugerindo um papel para o ATP e para os receptores P2X7 na modulação de aspectos comportamentais relacionados à inflamação.

A ativação dos receptores P2X7 por altas concentrações de ATP desempenha um papel fundamental na resposta inflamatória via ativação do complexo do inflamassoma NLRP3 e secreção das citocinas inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18). O inflamassoma NLRP3 é um complexo proteico 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 de IL-1 β e IL-18 em suas formas ativas (GURUNG et al., 2014, HALLE et al., 2008; WALSH et al., 2014).

O complexo inflamassoma está presente em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema imune periférico e SNC estando associado a diversas patologias, incluindo artrite reumatoide, doença de Alzheimer e depressão (ALCOCER-GOMEZ et al., 2014, DU et al., 2016, PAN et al., 2014). Estudos recentes sugerem um importante papel para o inflamassoma NLRP3 na ativação do sistema imunológico como resposta a sinais de dano celular (IWATA et al., 2013; WALSH et al., 2014; KAUFMANN et al., 2017). Além do efluxo de K⁺ gerado por um aumento nas concentrações de ATP, uma grande diversidade de estímulos que podem levar a ativação do inflamassoma NLRP3, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Um dos mecanismos que associa a formação de ROS à inflamação é mediado pela proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP). A TXNIP é um elemento constitutivamente ligado à enzima antioxidante tiorredoxina oxidoredutase (TRX). Em condições que elevam a concentração de ERO intracelularmente, como neuropatologias, este agregado é dissociado, e a TXNIP é unida ao complexo NLRP3, iniciando assim uma resposta inflamatória (TSCHOPP e SCHRODER, 2010) (**Figura 2**).

Figura 2: Ativação do complexo NLRP3 via produção de EROs e efluxo de K^+ .

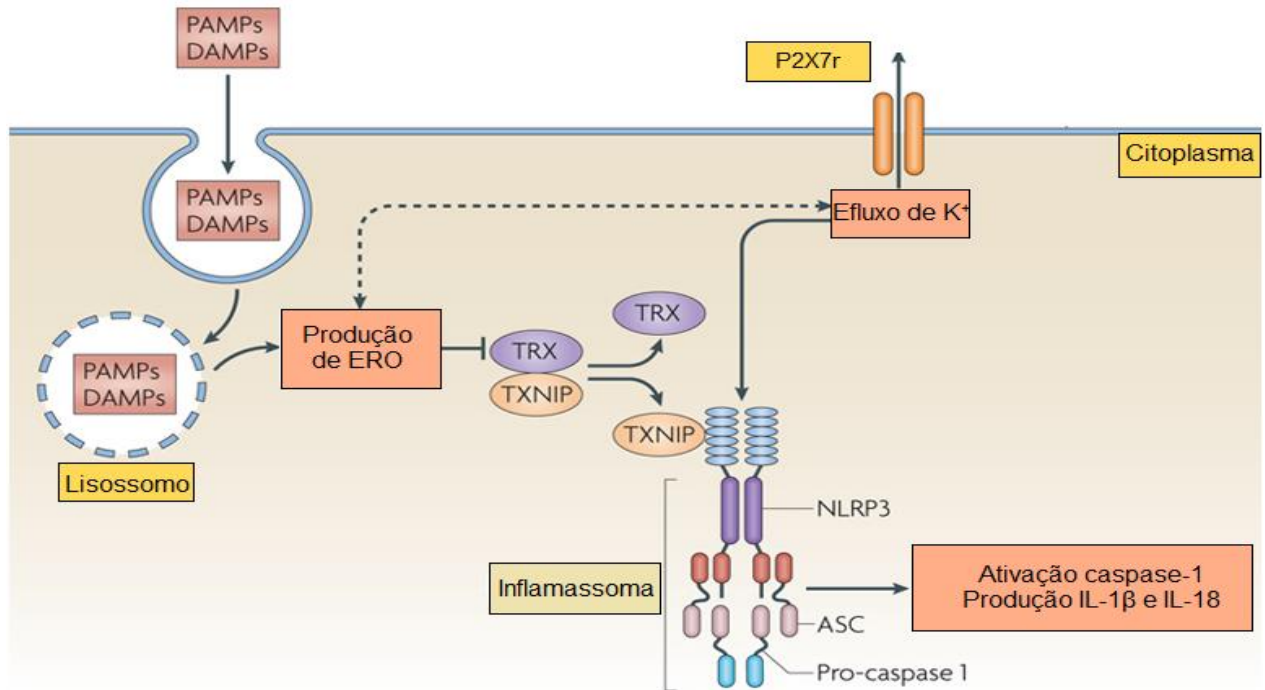


Figura 2: Complexo inflamassoma NLRP3 pode ser ativado através de elevadas concentrações de ATP extracelular gerados pelo estresse, que estimulam o efluxo de K^+ através de receptores P2X7. A ativação deste complexo atua na resposta inflamatória podendo gerar um aumento na secreção de citocinas inflamatórias como IL-1 β . Figura adaptada de Tschopp e Schroder, 2010.

1.4 JUSTIFICATIVA

As doenças que acometem o SNC como distúrbios psiquiátricos e as doenças neurodegenerativas são uma das causas mais comuns de doenças no mundo ocidental (OLESEN; LEONARDI, 2003) e aquelas que maiores custos absolutos terão nos próximos anos (ANDLIN-SOBOCKI et al., 2005). O estresse é considerado o principal fator ambiental envolvido na etiologia e progressão destas doenças e cerca de 75-90% das pessoas que procuram atendimentos de emergência apresentam problemas relacionados ao estresse (ZACHARKO et al., 1990). A presença de inflamação é uma característica comum associada aos processos degenerativos encontrados em várias destas neuropatologias e embora esta associação seja evidente na literatura tanto em pacientes quanto em modelos pré-clínicos, suas relações causais permanecem pouco elucidadas. Assim, a compreensão de diferentes aspectos neurobiológicos associados aos efeitos comportamentais do estresse e a busca de novos alvos farmacológicos capazes de conter a neuroinflamação, como o bloqueio dos receptores P2X7, podem oferecer novos caminhos no desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do bloqueio dos receptores P2X7 nas alterações comportamentais e neuroquímicas desencadeadas pelo estresse agudo de contenção em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Avaliar as alterações comportamentais induzidas pelo tratamento sub-crônico por sete dias com o antagonista de receptores P2X7 e pelo estresse agudo de contenção com foco no comportamento tipo-depressivo, tipo-ansioso e atividade locomotora dos camundongos;
- II) Avaliar o efeito do tratamento sub-crônico com o antagonista de receptores P2X7 e do estresse agudo de contenção nos níveis da citocina inflamatória IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal;
- III) Avaliar o efeito do estresse agudo de contenção e do tratamento sub-crônico com o antagonista de receptores P2X7 nos níveis da proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) no hipocampo;

3 HIPÓTESES

- I) O bloqueio farmacológico dos receptores P2X7 é capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso induzidos pelo estresse agudo de contenção;
- II) O bloqueio farmacológico dos receptores P2X7 é capaz de prevenir o aumento nos níveis de IL-1 β induzidos pelo estresse de contenção;
- III) O bloqueio farmacológico dos receptores P2X7 é capaz prevenir o aumento nos níveis da TXNIP no hipocampo dos animais submetidos ao estresse;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (30 – 40 g) com 50 dias de idade, provenientes do biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFSC durante todo o período experimental. Os animais foram mantidos em caixas de propileno de 30 cm X 20 cm X 13 cm, em grupos de 7 a 8 animais por caixa, com temperatura de 20-22°C, em ciclo claro-escuro de 12:12 h e com livre acesso à ração comercial para camundongos NUVITAL - Nuvilab CR1 e a água filtrada.

O protocolo de estresse e os testes comportamentais foram realizados na sala de comportamento do Departamento de Bioquímica (sala 103C) e os procedimentos bioquímicos nos laboratórios de Neurobiologia da Depressão (sala 204C), Laboratório de Neuroquímica I (sala 205C) e LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, interblocos B-C, sala 3).

O fármaco Brilliant Blue G (BBG), antagonista de receptores P2X7, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Brasil), dissolvido em salina e administrado na dose de 50 mg/kg. Nos grupos que não receberam o fármaco, foi administrado o veículo (solução salina 0,9%). Os tratamentos foram administrados pela via intraperitoneal (i.p.) em um volume constante de 10 ml/kg de peso do animal, uma vez ao dia, durante sete dias.

Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA, protocolo número 9282200317) e foram realizados todos os esforços para minimizar o número de animais utilizados nos experimentos.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 30 camundongos separados em 4 diferentes grupos: salina/controle (8 animais), salina/estresse (8 animais), BBG/controle (7 animais) e BBG/estresse (7 animais).

O protocolo de estresse agudo de contenção foi aplicado conforme previamente descrito (MORETTI et al., 2013, BUDNI et al., 2013). O modelo consiste na utilização de um cilindro de plástico para a contenção dos animais e restrição dos movimentos por 7 h. Vale ressaltar que

o estresse de contenção apenas restringe a movimentação dos animais sem, contudo, deixá-los imobilizados.

Todos os animais foram trazidos para a sala de comportamento às 18 h do dia anterior ao início do protocolo para sua aclimação. Os animais submetidos ao estresse foram retirados das suas caixas de residência às 5:00h, permaneceram por 7 h no estresse de contenção, e retornaram para as caixas de residência às 12:00h. Os animais do grupo controle foram mantidos nas caixas de residência. Após 40 minutos do término do estresse, os animais foram avaliados nos testes comportamentais (**Figura 3**).

Figura 3: Protocolo de tratamento.

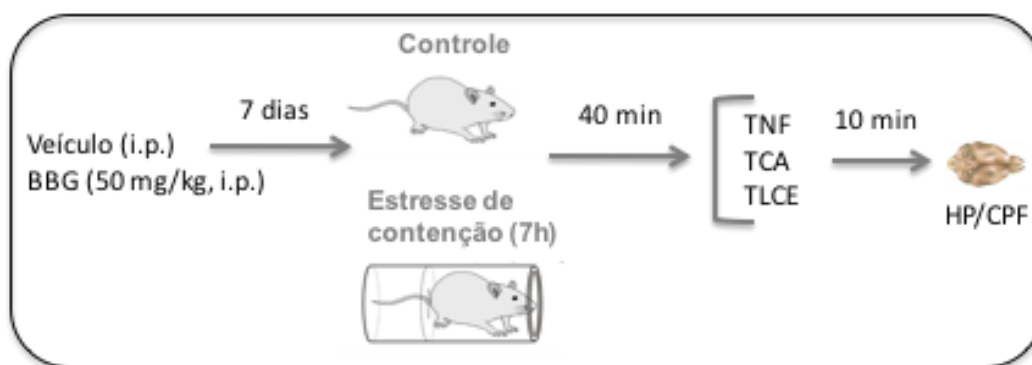


Figura 3: Os animais receberam tratamento com veículo (salina 0,9% i.p.) ou BBG (50 mg/kg, i.p.) por sete dias. Posteriormente os animais sofreram estresse de contenção por 7h. Os animais do grupo controle permaneceram em suas caixas. Após 40 minutos do término do protocolo de estresse, todos animais realizaram os testes comportamentais. Após os testes os animais foram decapitados e suas estruturas córtex pré-frontal e hipocampo foram utilizadas para avaliação bioquímica. Figura de autoria própria.

4.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os animais foram avaliados no teste do campo aberto (TCA) para atividade locomotora. Posteriormente, passaram pelo teste de nado forçado (TNF) e pelo teste do labirinto em cruz elevado (TLCE) para avaliação do comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso.

Alguns cuidados básicos foram sempre utilizados nos testes comportamentais, como aclimação dos animais na sala de comportamento e limpeza dos aparatos com álcool 10% entre cada sessão. Os animais foram eutanasiados imediatamente após o último teste comportamental.

4.3.1 Teste do Campo Aberto (TCA)

Foi realizado o TCA, proposto por Hall (1936), para excluir a possibilidade de que alterações no tempo de imobilidade no TNF sejam devidas a um efeito inespecífico sobre atividade locomotora dos animais. O teste foi realizado com um animal por vez em uma caixa de madeira (40 cm X 60 cm X 50 cm), cercada de paredes de vidro e com um assoalho dividido em 12 quadrantes iguais. Durante 6 minutos foi observado o número de quadrantes atravessados por cada camundongo. A atividade locomotora é avaliada conforme o cruzamento do animal pelos quadrantes com as quatro patas.

4.3.2 Teste de Nado Forçado (TNF)

O TNF é um dos modelos comportamentais mais utilizados para avaliar a atividade antidepressiva de fármacos. O método original foi descrito por Porsolt (1977). O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O roedor é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. A redução no tempo de imobilidade é o efeito observado após a administração aguda de várias classes de fármacos antidepressivos (PORSOLT et al., 1977), já o aumento deste tempo caracterizara um estado “depressivo” dos animais ou um efeito tipo-depressivo de fármacos.

4.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE)

O TLCE, proposto por Lister (1987), é um método baseado na avaliação do medo natural dos roedores a lugares abertos e altos e avalia o efeito tipo ansiolítico/ansio gênico de fármacos e protocolos experimentais. O procedimento consiste na utilização de um aparato com dois braços abertos (50 cm X 10 cm), com bordas de 1 cm de altura e dois braços fechados com iguais dimensões porém com bordas de 40 cm de altura, unidos por uma plataforma central de 10 cm², dispostos em forma de cruz, e elevados à 50 cm do chão. O animal é colocado no centro do aparato, virado para um dos braços abertos, e assim é realizada a contagem do número de entradas com as quatro patas e o tempo de permanência do camundongo nos braços abertos e fechados, durante cinco minutos. Um número maior de entradas e um maior tempo de permanência nos braços abertos são um indicativo de menor comportamento tipo-ansioso do

camundongo. Os dados foram expressos como porcentagem de tempo nos braços abertos do aparato em relação ao tempo total nos braços abertos e fechados, e número de entradas nos braços fechados, usado como um indicativo de locomoção.

4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados em homogenatos de membranas totais de hipocampo e córtex pré-frontal. Para este fim, os animais foram eutanasiados após o final dos testes comportamentais para dissecação das estruturas encefálicas. Os hemisférios cerebrais foram divididos e um deles foi utilizado para a preparação de amostras para a dosagem de IL-1 β por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e o outro para a imunodeteção de TXNip por Western Blot. Vale ressaltar que o uso de anestésicos interfere com os parâmetros bioquímicos analisados. Tendo em vista que os animais possuíam em torno de 40-50 g o método de eutanásia utilizado foi a decapitação. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até as análises.

4.4.1 Avaliação dos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β)

A dosagem de IL-1 β foi realizada por ELISA em amostras de hipocampo e córtex pré-frontal. Para a homogeneização das amostras os tecidos foram triturados mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 100 mM, EDTA 2 mM, NaF 200 mM, PMSF 100 mM, Na₃VO₄ 200 mM, Triton 100%, glicerol 50% e coquetel inibidor de proteases SIGMA). Os lisados foram centrifugados (10.000 g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. Para a realização da dosagem de IL-1 β por ELISA foram utilizados 100 μ L do sobrenadante dos lisados celulares e 10 μ L foram separados para a dosagem de proteínas totais. A dosagem de IL-1 β por ELISA, foi realizada usando kit comercial (eBioscience) seguindo as orientações do fabricante.

A técnica consiste na incubação das placas de 96 poços com anticorpos específicos para IL-1 β overnight a 4°C. Em seguida foram realizadas cinco lavagens com uma solução de PBS 0,05% Tween 20. Foi realizado o bloqueio por 1 h em temperatura ambiente (solução ELISA/ELISPOT 1:4). Após mais 5 lavagens, 100 μ L das amostras foram adicionados em cada poço e 100 μ L da curva padrão de IL-1 β nas concentrações de 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml e 7,812 pg/ml. com posterior

incubação overnight a 4°C. A placa foi novamente lavada 5 vezes com PBS 0,05% Tween 20 e foi adicionado o anticorpo de detecção, permanecendo sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário foram procedidas 5 lavagens e adicionada uma solução contendo avidina associada à peroxidase a cada poço, por mais 1h em temperatura ambiente. A placa foi então submetida a 7 lavagens com solução PBS 0,05% Tween 20 e então adicionou-se em cada poço o substrato tetrametilbenzidina (TMB) incubado por 15 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Após o período de incubação, o H₃PO₄ 1M foi adicionado para parar a reação a leitura da absorbância foi determinada através do espectrofotômetro Spectramax nos comprimentos de onda 450 nm e 570 nm.

4.4.2 Avaliação do imunoconteúdo de TXNIP

Para a avaliação do imunoconteúdo de TXNIP por Western blot as amostras de hipocampo foram homogeneizadas mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 100 mM, EDTA 2 mM, NaF 200 mM, PMSF 100 mM, Na₃VO₄ 200 mM, Triton 100%, glicerol 50% e coquetel inibidor de proteases SIGMA). Os lisados foram centrifugados (10.000 g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante dos lisados celulares foi diluído 1/1 (v/v) em solução contendo Tris 500 mM pH 6,8, EDTA 100 mM, SDS 10% e aquecido a 100°C por 5 min para finalizar a desnaturação de proteínas. Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. O restante da amostra foi diluído em Sample Dilution 25% (glicerol 100%, TRIS 500mM e azul de bromofenol, pH 6,8), e β-mercaptoetanol 8%.

A partir da detecção da concentração de proteínas totais nos homogenatos de hipocampo, 30 µg de proteína foram utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). A separação das proteínas foi feita em um gel com 10% de poliacrilamida e um gel de entrada com 4% de poliacrilamida. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do aparelho Semy-dry (1,2 mA/cm² por 1,5h). Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com a solução de Ponceau 0,5%. Após esse processo, as membranas foram bloqueadas durante 1 h com leite em pó desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O imunoconteúdo de TXNIP e β-actina (utilizada como padrão interno) foi identificado através da incubação com anticorpos primários específicos (anti-TXNIP, feito em coelho, Santa Cruz, diluição 1:3000; anti-β-actina, feito em camundongo, Santa Cruz, diluição 1:2000) diluídos

em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05% pH 7,5) contendo albumina de soro bovino (BSA 2%). As membranas ficaram incubadas com os anticorpos primários overnight a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo conjugados com peroxidase (Santa Cruz, 1:2500). A imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente ECL (GE Healthcare) no equipamento fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando o software ScionImage. O imunoconteúdo das proteínas TXNIP e β -actina foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas/DO da β -actina. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%) (LEAL et al., 2002, LEAL et al., 2007, NEIS, 2017).

4.4.3 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada seguindo o método de Peterson (1977) – uma adaptação do método de Lowry. Devido à alta sensibilidade do reagente folin-fenol (solução contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico) em ser reduzido quando reage com a cadeia lateral de aminoácidos que formam proteínas em geral, é utilizado para determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios (ZAIA et al., 1998). Foi utilizada a albumina de soro bovino como curva-padrão e a mensuração da absorbância foi realizada em 620 nm (através do equipamento leitor de absorbância Spectramax).

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistics e os gráficos no programa GraphPad Prism 6. Os resultados obtidos dos testes comportamentais e nas análises por ELISA foram expressos como a média + erro padrão da média (E.P.M.), os resultados obtidos das análises por Western Blot foram expressos como porcentagem da média do controle + E.P.M. As variáveis foram comparadas pela análise da variância de duas vias, seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan, quando apropriado. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO

Conforme observado na **Figura 4A**, o estresse de contenção aumentou o tempo de imobilidade dos animais quando comparado ao grupo controle. O tratamento com BBG (50 mg/kg, i.p., por sete dias) foi capaz de prevenir o efeito tipo-depressivo do estresse. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com BBG [$F(1,23) = 17,36$, $p < 0,0001$], do estresse [$F(1,23) = 7,79$, $p < 0,01$], mas não da interação entre tratamento e estresse [$F(1,23) = 0,011$, $p = 0,915$]. A análise de *post-hoc* de Duncan revelou que o grupo submetido ao estresse e tratado com veículo apresentou um aumento no tempo de imobilidade com relação ao grupo controle tratado com veículo ($p < 0,001$). Contudo, o grupo tratado com BBG e submetido ao estresse apresentou um tempo de imobilidade significativamente menor quando comparado ao grupo tratado com veículo e submetido ao estresse ($p \leq 0,05$). O tratamento com BBG por 7 dias nos animais controle não reduziu significativamente o tempo de imobilidade quando comparado aos animais controle tratados com veículo ($p = 0,07$).

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 4B**, o tratamento com BBG e o estresse de contenção não foram capazes de alterar a locomoção dos animais no TCA. A ANOVA de duas vias não revelou um efeito significativo do tratamento com BBG [$F(1,20) = 1,74$, $p = 0,20$], sem diferenças para o estresse [$F(1,20) = 0,58$, $p = 0,45$] ou para a interação entre o tratamento e o estresse [$F(1,20) = 0,49$, $p = 0,48$].

Figura 4: Comportamento tipo-depressivo

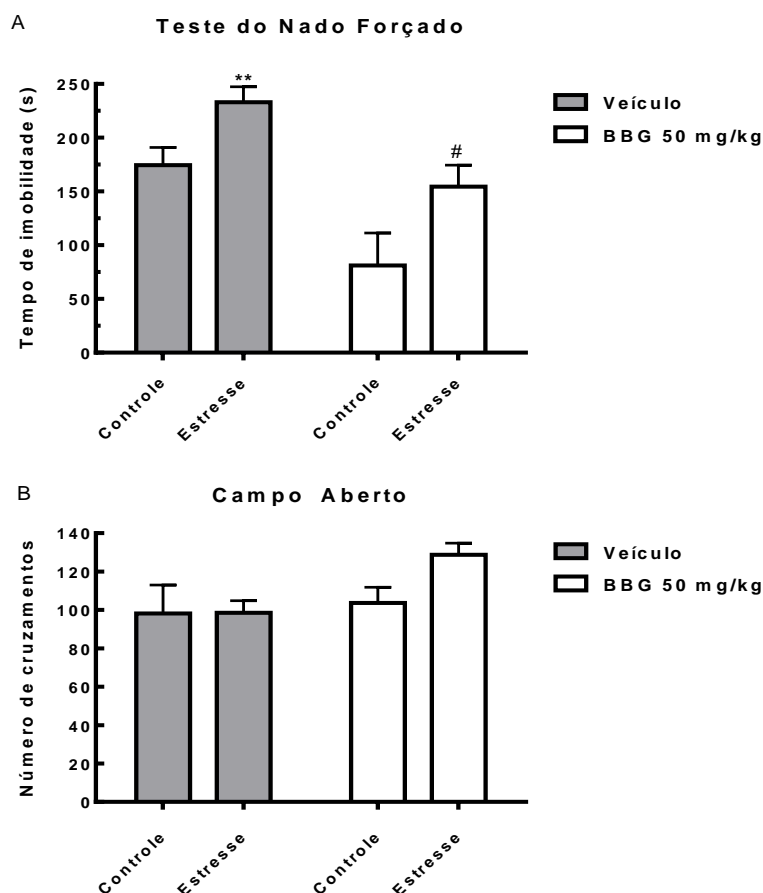


Figura 4: Efeito do tratamento com BBG (50 mg/kg, 7 dias) e do estresse de contenção (7 h) no tempo de imobilidade dos animais no TNF (figura A) e no número de cruzamentos no TCA (figura B). Os resultados estão expressos como a média + o erro padrão da média, $n = 4 - 8$. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle/veículo, # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo estresse/veículo

5.2 COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

Os resultados apresentados na **Figura 5** mostram o efeito do tratamento com BBG por sete dias e do estresse de contenção no comportamento tipo-ansioso avaliado através do TLCE. Com relação ao tempo de permanência nos braços abertos, **Figura 5A**, a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo do estresse [$F(1,16) = 9,27$, $p < 0,01$], mas não do tratamento com BBG [$F(1,16) = 0,044$, $p = 0,83$], ou da interação entre estresse e tratamento [$F(1,16) = 0,59$, $p = 0,45$]. A análise de *post-hoc* de Duncan revelou que os animais tratados

com BBG e submetidos ao estresse de contenção apresentaram uma redução no tempo de permanência nos braços abertos com relação ao grupo controle tratado com veículo ($p < 0,05$).

Com relação ao número de entradas nos braços fechados, (**Figura 5B**) a ANOVA de duas vias não demonstrou efeito significativo do tratamento [$F(1,20) = 0,0039$, $p = 0,95$], do estresse [$F(1,20) = 0,46$, $p = 0,50$] ou da interação entre tratamento e estresse [$F(1,20) = 0,65$, $p = 0,42$].

Figura 5. Comportamento tipo-ansioso

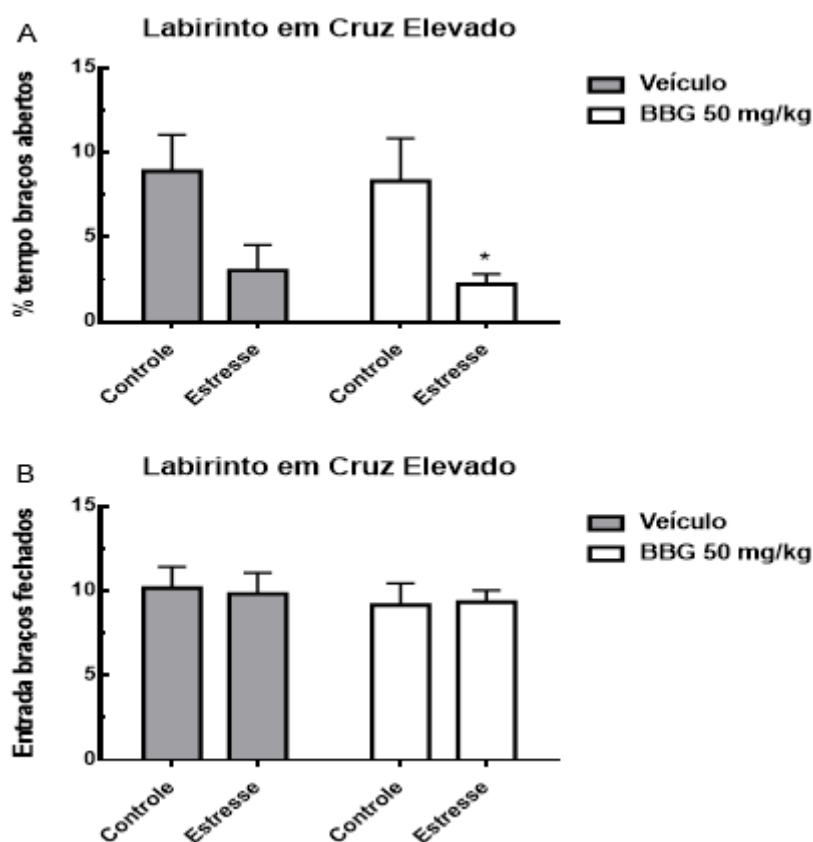


Figura 5: Efeito do tratamento com BBG (50 mg/kg, 7 dias) e do estresse de contenção (7 h) no tempo de permanência dos animais nos braços abertos TLCE (figura A) e no número de entradas nos braços fechados (figura B). Os resultados estão expressos como a média + o erro padrão da média, $n = 4 - 6$. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle/veículo.

5.3 NÍVEIS DE IL-1 β NO HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

Os resultados apresentados na **Figura 6** mostram o efeito do tratamento com BBG e do estresse de contenção sobre os níveis de IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal. No

hipocampo, a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo do estresse [$F(1,21) = 9,18, p < 0,001$], mas não do tratamento com BBG [$F(1,21) = 0,73, p = 0,40$], ou da interação entre estresse e tratamento [$F(1,21) = 0,20, p = 0,65$]. Com relação aos níveis de IL-1 β no córtex pré-frontal, a ANOVA de duas vias também demonstrou um efeito significativo do estresse [$F(1,17) = 12,30, p < 0,01$], mas não do tratamento com BBG [$F(1,17) = 0,066, p = 0,42$], ou da interação entre estresse e tratamento [$F(1,17) = 2,32, p = 0,14$]. A análise de *post-hoc* de Duncan para as duas estruturas revelou que os animais tratados com veículo e submetidos ao estresse apresentaram uma redução nos níveis de IL-1 β com relação ao grupo controle tratado com veículo ($p < 0,05$). Os níveis de IL-1 β no grupo tratado com BBG e submetidos ao estresse de contenção não foram significativamente diferentes dos grupos controle/veículo e estresse/veículo em ambas as estruturas.

Figura 6: Níveis de IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal

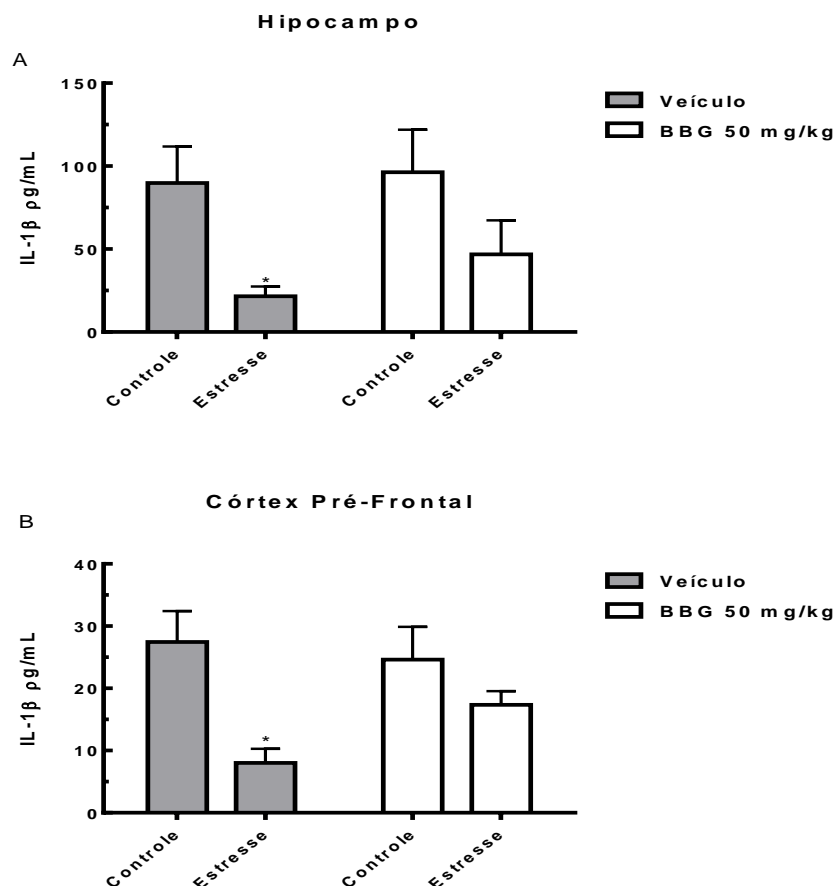


Figura 6: Efeito do tratamento com BBG (50 mg/kg, 7 dias) e do estresse de contenção (7 h) nos níveis de IL-1 β (pg/mL) no hipocampo (figura A) e no córtex pré-frontal (figura B). Os resultados estão expressos como a média + o erro padrão da média, $n = 3 - 8$. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle/veículo.

5.4 IMUNOREATIVIDADE DE TXNIP NO HIPOCAMPO

Os resultados apresentados na **Figura 7** mostram o efeito do tratamento com BBG e do estresse de contenção sobre a imunoreatividade da proteína TXNIP no hipocampo. A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo do estresse [$F(1,19) = 4,62, p < 0,05$], mas não do tratamento com BBG [$F(1,19) = 1,18, p = 0,29$], ou da interação entre estresse e tratamento [$F(1,19) = 0,048, p = 0,82$]. A análise de *post-hoc* de Duncan revelou que o grupo tratado com BBG e submetido ao estresse apresentou um aumento nos níveis de TXNIP com relação ao grupo controle tratado com veículo ($p < 0,05$).

Figura 7: Imunoreatividade de TXNIP no hipocampo

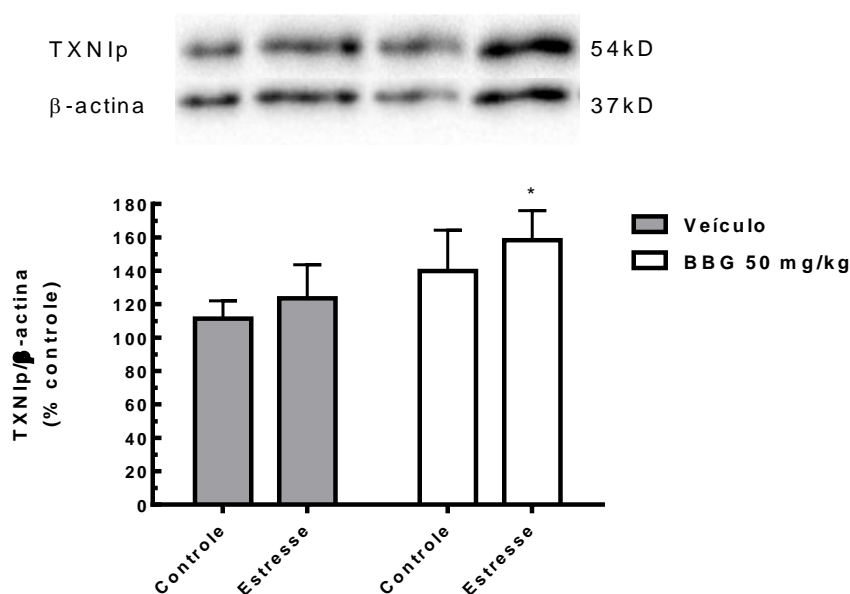


Figura 7: Efeito do tratamento com BBG (50 mg/kg, i.p., 7 dias) e do estresse de contenção (7h) no imunocónteuído de TXNIP (54kD) e β -actina (37kD) no hipocampo. Os resultados estão expressos como a média da porcentagem em relação ao controle + erro padrão da média da razão da imunoreatividade da TXNIP/ β -actina, $n = 5 - 6$. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle/veículo.

6 DISCUSSÃO

O estresse de contenção é um modelo de alta validade fenomenológica e de constructo para estudo de características associada aos efeitos de um estresse agudo, considerado um dos principais fatores capazes de precipitar a ocorrência de episódios de depressão e ansiedade em humanos (SULAKHIYA et al., 2016). No presente estudo demonstramos que o estresse agudo de contenção produziu um comportamento tipo-depressivo no TNF e tipo-ansioso no TLCE, associado a uma redução nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal, bem como um aumento na expressão da proteína TXNIP hipocampal.

Com relação ao efeito tipo-depressivo, nossos resultados corroboram dados da literatura que demonstram que o estresse agudo de contenção em camundongos causa um comportamento tipo-depressivo no TNF (MORETTI et al., 2013, BUDNI et al., 2013). O TNF é um modelo de desespero comportamental amplamente utilizado para o estudo do composto com atividade antidepressiva ou comportamento tipo-depressivo (PORSOLT et al., 1977). O teste consiste em observar o comportamento animal frente à uma situação de estresse inescapável, onde os animais apresentam comumente uma agitação inicial seguida de um comportamento de imobilidade. A redução no tempo de imobilidade está relacionada a um comportamento tipo-antidepressivo e é observada após tratamento agudo com fármacos antidepressivos clássicos, e o aumento do tempo de imobilidade é interpretado com um efeito tipo-depressivo (PORSOLT et al., 1977).

Nossos resultados também demonstram que o estresse de contenção gerou um comportamento tipo-ansioso no TLCE. Em modelos animais, a exposição de roedores a diferentes agentes estressores tanto físicos quanto psicológicos e a manifestação de um comportamento tipo-depressivo estão frequentemente associados a altos níveis de ansiedade (HU et al., 2017, WILLNER, 2005). O TLCE é um modelo que avalia o comportamento tipo-ansioso calculado através do tempo de permanência nos braços abertos, relacionado com uma reação espontânea de esquiva ou exploração do animal em um ambiente aberto e elevado. O teste é capaz de mostrar os efeitos ansiogênicos de fármacos ou manipulações experimentais, ao diminuir o tempo de permanência do animal nos braços abertos e também efeitos ansiolíticos de fármacos, ao aumentar o tempo de permanência exploratória do animal nos braços abertos do aparato (LISTER, 1987).

O tratamento crônico com BBG, antagonista de receptores P2X7 não produziu efeito antidepressivo *per se*, mas foi capaz de prevenir o efeito tipo-depressivo do estresse no TNF.

Recentemente, estudos têm demonstrado que a depleção genética dos receptores P2X7 está associada a um comportamento tipo-antidepressivo em modelos preditivos como o TNF e o teste de suspensão pela cauda (BASSO et al., 2009, CSOLLE et al., 2013) e com resiliência ao fenótipo depressivo induzido por um estresse de natação forçada repetida (BOUCHER et al., 2011). O antagonismo de receptores P2X7 como estratégia protetora aos efeitos do estresse de contenção já foi proposto anteriormente (IWATA et al., 2016, YUE et al., 2017). Além disso, a administração sub-crônica de um antagonista de receptores P2X7 foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo e a liberação de citocinas pró-inflamatórias em um modelo de depressão induzida por administração de LPS (MA et al., 2014).

No presente trabalho, o tratamento por sete dias com BBG não alterou o comportamento tipo-ansioso induzido pelo estresse. Contudo, o envolvimento dos receptores P2X7 em comportamentos associados a ansiedade permanece pouco elucidado. BASSO et al., (2009) demonstraram que a depleção genética dos receptores P2X7 não alterou o comportamento dos animais no TLCE. Além disso, a depleção genética ou o bloqueio farmacológico dos receptores P2X7 induziu um comportamento tipo-ansioso (YUE et al., 2017). Nossos resultados demonstram ainda que nem o estresse de contenção, nem o tratamento com BBG, produziram alterações na locomoção, avaliada no teste do campo aberto. Desta forma, nossos resultados suportam a idéia de que estes efeitos comportamentais do estresse de contenção e da administração de BBG são específicos e não causados por alterações na atividade locomotora dos animais.

No presente trabalho o estresse agudo de contenção foi associado a uma redução nos níveis de IL-1 β no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais, avaliados 1h após o término do estresse. Um aumento nos níveis centrais de IL-1 β tem sido descrito em diversos modelos de estresse agudo e crônico (CLARKE et al., 2017, YUE et al., 2017, IWATA et al. 2017). Contudo, esses achados não são homogêneos e alguns trabalhos não encontraram um aumento significativo dos níveis de IL-1 β imediatamente após o estresse agudo de choque na cauda em camundongos (NGUYEN et al., 2008). Estes resultados sugerem que o efeito do estresse sobre os níveis de IL-1 β e a resposta inflamatória podem ser dependentes do tipo e duração do agente estressor. Iwata e colaboradores (2013) demonstraram que ratos submetidos a um estresse de contenção por 60 minutos tiveram um pico de secreção de IL-1 β em até 2 h após o estímulo estressor, e esses níveis normalizam-se na terceira hora após o estresse. Assim, como nosso protocolo teve a duração de sete horas de contenção não podemos descartar a hipótese de que um aumento transitório nos níveis de IL-1 β tenha ocorrido em um intervalo de tempo anterior

a nossa avaliação. Além disso, outros fatores podem estar associados a redução nos níveis de IL-1 β encontrados. Nguyen et al. (2008) relatam, que o aumento nos níveis de glicocorticóides desencadeado pelo estresse pode inibir o subsequente aumento nos níveis de IL-1 β . De fato, o aumento agudo nos níveis de glicocorticóides pode causar uma supressão da transcrição e reduzir a estabilidade do RNAm para IL-1 β (LEE et al., 1988). A resposta adaptativa do eixo HPA gera uma inibição da secreção de citocinas, possuindo um potencial anti-inflamatório (BARNES; ADCOCK, 2009). Talvez o estresse crônico possa envolver um aumento mais caracterizado na secreção de citocinas inflamatórias, devido ao tempo sustentado em exposição ao estresse e uma possível desregulação da secreção de glicocorticóides, enquanto o estresse agudo pode principalmente alterar os níveis plasmáticos de glicocorticóides (ARMARIO et al., 2008, MALISCH, 2010). Contudo, novos experimentos são necessários para esclarecer melhor o impacto do estresse agudo nos níveis centrais de IL-1 β .

Os receptores P2X7 são abundantemente expressos na microglia, em menor extensão em astrócitos e oligodendrócitos e nos terminais pré-sinápticos de neurônios. O ATP é um importante padrão molecular associados ao dano (DAMP), e o efluxo de K⁺ causado pela ativação dos receptores P2X7 tem sido implicado na indução de processos inflamatórios agudos e crônicos (MARIATHASAN et al., 2006). A ativação do subtipo P2X7 por altas concentrações de ATP desempenha um papel fundamental na resposta inflamatória via ativação do complexo do inflamassoma NLRP3 e secreção de IL-1 β (GURUNG et al., 2014; HALLE et al., 2008; WALSH et al., 2014). Demonstramos neste trabalho que o tratamento sub-crônico com o antagonista de receptores P2X7 causou uma prevenção parcial da redução dos níveis de IL-1 β induzida pelo estresse de contenção. Podemos sugerir que o bloqueio dos receptores P2X7 minimizou o impacto do estresse sobre a resposta inflamatória. Vale ressaltar que as citocinas inflamatórias como a IL-1 β também são importantes em diferentes processos fisiológicos, incluindo mecanismos de neuroplasticidades, neurogênese e memória (PATTERSON; NAWA, 1993, SAPHIRA-LICHTER et al., 2007). Assim, níveis reduzidos destas moléculas também poderiam ser potencialmente prejudiciais.

Um dos mecanismos associando o estresse à indução de inflamação é a produção de espécies reativas de oxigênio e a ativação da proteína TXNIP. A produção de espécies reativas de oxigênio é induzida pelo excesso de ATP extracelular, e foi demonstrada como um dos fatores capazes de ativas o desacoplamento da enzima antioxidante tioredoxina (TRX) da sua proteína de interação TXNIP (TSCHOPP e SCHRODER, 2010). Uma vez livre da TRX, a TXNIP é um dos fatores associados a ativação do complexo do inflamassoma NLRP3 e

produção de citocinas inflamatórias (TSCHOPP e SCHRODER, 2010). Esse é o primeiro trabalho demonstrando que o estresse gera um aumento na expressão de TXNIP, possivelmente por aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio. Contudo, o tratamento sub-crônico com o antagonista de receptores P2X7 não só não foi capaz de prevenir esse aumento, como induziu um aumento ainda maior nos níveis de TXNIP no hipocampo dos animais submetidos ao estresse. Esses resultados sugerem que os efeitos tipo-antidepressivo do antagonista de receptores P2X7 pode estar parcialmente envolvido com a normalização de uma disfunção imune causada pelo estresse, mas que não parece estar envolvido com a via de sinalização intracelular e inflamação ativada pela TXNIP.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nossos resultados até o momento corroboram a literatura, demonstrando que o estresse de contenção (7 horas) é capaz de gerar um perfil tipo-depressivo e tipo-ansioso nos animais. O tratamento por 7 dias com o BBG (50 mg/kg), foi capaz de prevenir o efeito tipo-depressivo, mas não o efeito tipo-ansioso do estresse. As avaliações bioquímicas demonstram que o estresse de contenção reduziu os níveis de IL-1 β no hipocampo e córtex pré-frontal, efeito que foi parcialmente prevenido pelo tratamento com BBG. Também foi demonstrado um possível envolvimento do estresse oxidativo no desencadeamento do comportamento tipo-depressivo gerado pelo estresse de contenção verificado pelo aumento do imunocontéudo de TXNIP no hipocampo dos animais submetidos ao estresse. Contudo, o tratamento com BBG não foi capaz de prevenir esse aumento.

Pesquisas relacionadas ao envolvimento da inflamação e do estresse oxidativo nas alterações comportamentais e no desenvolvimento de neuropatologias relacionadas ao estresse têm recebido ênfase nos últimos anos, tendo em vista a associação entre o SNC e sistema imune. Como perspectivas, pretendemos investigar o efeito do bloqueio dos receptores P2X7 e do estresse agudo de contenção na ativação do complexo inflamassoma NLRP3, responsável pela maturação e secreção de IL-1 β . Além disso, pretendemos esclarecer melhor o papel da TXNIP no modelo de estresse e o efeito do bloqueio dos receptores P2X7, através da avaliação do seu imunocontéudo no córtex pré-frontal, e avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no hipocampo e córtex pré-frontal. Uma melhor elucidação do envolvimento do eixo HPA e componentes purinérgicos e seus receptores no estresse agudo também se faz necessária, assim, a avaliação dos níveis de glicocorticoides e de ATP extracelular também são sugeridos.

8 REFERÊNCIAS

- ALCOCER-GÓMEZ, E. *et al.* NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. **Brain Behav Immun**, v. 36, p. 111- 117, 2013.
- ARMARIO, A.; ESCORIHUELA, R. M.; NADAL, R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 32, n. 6, p. 1121-35, 2008.
- ANDLIN-SOBOCKI, P.; JONSSON, B.; WITTCHEN, H. U.; OLESEN, J. Cost of disorders of the brain in Europe. **Eur J Neurol**. v. 12, n. 1, p. 1-27, 2005.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **Lancet**. v. 373, n. 9678, p. 1905-17, 2009.
- BASSO, A. M. *et al.* Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. **Behav Brain Res**. v. 198, n. 1, p. 83-90, 2009.
- BORROW, A. P.; STRANAHAN, A.M.; SUCHECKI, D.; YUNES, R. Neuroendocrine regulation of anxiety: Beyond the HPA axis. **J. Neuroendocrinol**. v. 28, n. 7, p. 1-19, 2016.
- BUDNI, J., *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Exp Neurol**. v. 240, p. 112-121, 2012.
- BUSILLO, J. M.; CIDLOWSKI, J. A. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve and restore. **Trends Endocrinol Metab**. v. 24, n. 3, p. 109–119, 2013.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Front Pharmacol**. v. 8, n. 661, p. 1-55, 2017.
- CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J.A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nat Rev Immunol**. v. 17, n. 4, p. 233-34, 2017.
- CHROUSOS, G. P. *et al.* Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance/hypersensitivity. potential clinical implications. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 154, n. 2, p. 39-43, 1996.
- CLARKE, M. *et al.* Ketamine modulates hippocampal neurogenesis and pro-inflammatory cytokines but not stressor induced neurochemical changes. **Neuropharmacology**. v. 112 (A), p. 210-20, 2017.
- COHEN, L. *et al.* Depressive symptoms and cortisol rhythmicity predict survival in patients with renal cell carcinoma: role of inflammatory signaling. **PLoS One**. v. 7, n. 8, p. 1-8, 2012.

CSOLLE, C. *et al.* The absence of P2X7 receptors 17 (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. **Int J Neuropsychopharmacol.** v. 16, n. 1, p. 213-33, 2013.

DOMINGOS, L. B.; HOTT, S. C. TERZIAN, A. L. B.; RESSTEL, L. B. M. P2X7 purinergic receptors participate in the expression and extinction processes of contextual fear conditioning memory in mice. **Neuropharmacology.** p. 1-8, 2017.

DU, R. H. *et al.* Uncoupling protein 2 modulation of NLRP3 inflammasome in astrocytes and its implications in depression. **Redox Biol.** p. 178-187, 2016.

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

FRENGUELLI, B. G. The Purine Salvage Pathway and the Restoration of Cerebral ATP: Implications for Brain Slice Physiology and Brain Injury. **Neurochem Res.** p. 1-15, 2017.

GURUNG, P.; LUKENS, J. R.; KANNEGANTI, T.D. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. **Trend Mol Med.** v. 21, n. 3, p. 193-201, 2014.

HALL, C. S. Emotional behaviour in the rat: III The relationship between emotionality and ambulatory activity. **J. Comp. Psychol.** v. 22, n. 3, p. 345–352, 1936.

HALLE, A. *et al.* c. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. **Nat Immunol.** v 9, n. 8, p. 857-65, 2008.

HU, C. *et al.* Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **PLoS One.** v. 12, n. 9, p. 1-15, 2017.

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

KAUFMANN, F. N. *et al.* Nlrp3 inflammasome-driven pathways in depression: clinical and preclinical findings. **Brain Behav Immun.** v. 64, p. 367-83, 2017.

KIBEL, A.; DRENJANCEVIC-PERIC, I. Impact of glucocorticoids and chronic stress on progression of Parkinson's disease. **Med Hypotheses.** v. 71, n. 6, p. 952-6, 2008.

LATHE, R. Hormones and the hippocampus. **J. of Endocrinology.** v. 169, n. 2, p. 205-31, 2001.

LEE, S. W. *et al.* Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 85, n. 4, p. 1204-8, 1988.

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

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

LI, X-Q. *et al.* Chronic restraint stress exacerbates nociception and inflammatory response induced by bee venom in rats: the role of the P2X7 receptors. **Neurol Res.** v. 38, n. 2, p. 158-65, 2016.

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

LUCASSEN, P. J. *et al.* Stress, depression and hippocampal apoptosis. **CNS Neurol Disord Drug Targets.** v. 5, n. 5, p. 31-46, 2006.

LUPIEN S. J. *et al.* Cortisol levels during aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. **Nat Neurosci.**, v. 1, n. 1, p. 69-73, 1998.

MA, M.; REN, Q.; ZHANG, J. C.; HASHIMOTO, K. Effects of Brilliant Blue G on Serum Tumor Necrosis Factor- α Levels and Depression-like Behavior in Mice after Lipopolysaccharide Administration. **Clin Psychopharmacol Neurosci.** v. 12, n. 1, p.31-6, 2014.

MADRIGAL, J. L. *et al.* Stress-induced oxidative changes in brain. **CNS Neurol Disord Drug Targets.** v. 5, n. 5, p. 561-8, 2006.

MALISCH, J. L.; SATTERLEE, D. G.; COCKREM, J. F.; WADA, H.; BREUNER, C. W. How acute is the acute stress response? Baseline corticosterone and corticosteroid-binding globulin levels change 24h after an acute stressor in Japanese quail. **Gen Comp Endocrinol.** v. 165, n. 2, p. 345-50, 2010.

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

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

MORETTI, M. *et al.* Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **J Mol Neurosci.** v. 49, n. 1, p. 68-79, 2013.

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

- NGUYEN, K. T. *et al.* Timecourse and corticosterone sensitivity of the brain, pituitary, and serum interleukin-1b protein response to acute stress. **Brain Res.** v. 859, n. 2, p. 193-201.
- OLESEN, J.; LEONARDI, M. The burden of brain diseases in Europe. **Eur J Neurol.** v. 10, n. 5, p. 471-7, 2003.
- PAN, Y.; CHEN, X. Y.; ZHANG, Q. Y.; KONG, L. D. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. **Brain Behav Immun.** v. 41, p. 90-100, 2014.
- PATTERSON, P. H.; NAWA, H. Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. **Cell.** v. 72, n. 10, p. 127-137, 1993.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem.** v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther.** v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.
- RAMESH, G.; MACLEAN, A. G.; PHILIPP, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators of Inflamm.** v. 2013, 2013.
- RICHTER, F. *et al.* Effects of interleukin-1 β on cortical spreading depolarization and cerebral vasculature. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 37, n. 5, p. 1791-1802, 2017.
- SAPHIRA-LICHTER, I. *et al.* Cytokines and cholinergic signals co-modulate surgical stress-induced changes in mood and memory. **Brain Behav Immun.** v. 22, n. 3, p. 188-98, 2007.
- SAPOLSKY, R. M.; UNO, H.; REBERT, C. S.; FINCH, C. E. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. **J. of Neuroscience.** v. 10, n. 9, p. 2897-2902, 1990.
- SATO, H.; TAKAHASHI, T.; SUMITANI, K.; TAKATSU, H.; URANO, S. Glucocorticoid Generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, Leading to Impairment of Cognitive Function of Rats. **J Clin Biochem Nutr.** v. 47, n. 3, p. 224-32, 2010
- SHELINE, Y.I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry.** v. 54, n. 3, p. 338-52, 2003.
- SULAKHIYA, K. *et al.* Effect of *Beta vulgaris* Linn. Leaves Extract on Anxiety- and Depressive-like Behavior and Oxidative Stress in Mice after Acute Restraint Stress. **Pharmacognosy Res.** v. 8, n. 1, p. 1-7, 2016.
- SWAYNE, L. A.; BOYCE, A. K. J. Regulation of Pannexin 1 Surface Expression by extracellular ATP. Potential Implications for Nervous System Function in Health and Disease. **Front Cell Neurosci.** v. 11, n. 230, p. 1-11. Ago, 2017.

TAKESHITA, Y.; RANSOHOFF, R. M. Inflammatory cell trafficking across the blood–brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. **Immunol Rev.** v. 248, n. 1, p. 228-39, 2012.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nat Rev Immunol.** v.10, n. 3, p. 210-5, 2010.

VOLLMAYR, B.; HENN, F.A. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. **Brain Res. Protoc.** v. 8, n. 1, p. 1–7, 2001.

VYAS, S., *et al.* Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. **Neural Plast.** v. 2016, 2016.

WALSH, J. G., MURUVE, D. A., POWER, C. Inflammasomes in the CNS. **Nat Rev Neurosc** v. 15, n. 2, p. 84-97, 2014.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology.** v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.

WILSON, R. S. *et al.* Chronic distress and incidence of mild cognitive impairment. **Neurology** v. 68, n. 24, p. 2085-92, 2007.

YUE, N. Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. **J Neuroinflammation** v. 14, n. 1, p. 102. 2017.

ZACHARKO, R. M. *et al.* Behavioral characterization of intracranial self-stimulation from mesolimbic, mesocortical, nigrostriatal, hypothalamic and extra-hypothalamic sites in the non-inbred CD-1 mouse strain. **Behav Brain Res.** v. 36, n. 3, p. 251-81, 1990.

ZAIA, D. A. M., *et al.* Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. **Química Nova.** v. 21, n. 6, p. 787-93, 1998.