GEANNE ARANTES FREITAS

Avaliação da neuroinflamação e epididimite induzida em um modelo de transtorno de estresse pós-traumático: papel da β -defensina na modulação celular inflamatória

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Christina W. Avellar

Coorientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão Original

São Paulo
2019

RESUMO

FREITAS, G A. **Avaliação da neuroinflamação e epididimite induzida em um modelo de transtorno de estresse pós-traumático:** papel da β -defensina na modulação celular inflamatória. 2019. 120 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Indivíduos expostos a estresse estão em risco de desenvolver várias desordens mentais, incluindo o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT), uma condição debilitante que ocorre geralmente em comorbidade com outras condições psiquiátricas e, também, disfunções sexuais. Além de ser um transtorno psiquiátrico, o TEPT tem sido também associado a desregulação da imunidade inata, entre outros fatores metabólicos e inflamatórios. Embora o TEPT tem sido ligado a uma condição inflamatória sistêmica, pouco é conhecido dos efeitos celulares e molecular da imunidade inata no sistema nervoso central (SNC) e o impacto no ambiente pós-testicular (epidídimo) e fertilidade masculina. No presente estudo, o objetivo foi avaliar as consequências do estresse por isolamento social (SI), que mimetiza no camundongo adulto a condição clínica de PTSD, em componentes celulares e moleculares da imunidade inata no SNC e epidídimo. Os objetivos específicos foram: 1) caracterizar o padrão de expressão da β -defensina SPAG11C no SNA de animais controles; 2) avaliar os efeitos do IS no padrão de expressão e regulação de componentes celulares e moleculares da imunidade inata, incluindo a β -defensina SPAG11C, no SNC e em mediadores inflamatórios plasmáticos e teciduais; e 3) avaliar os efeitos do IS no perfil de expressão e regulação de componentes celulares e moleculares da imunidade inata, incluindo a β -defensina SPAG11C, no epidídimo e em parâmetros espermáticos. Em conjunto, os resultados apontam para novos aspectos do entendimento do papel de componentes da imunidade inata na neuroinflamação do TEPT e como esta condição clínica impacta a imunobiologia epididimária levando a uma epididimite que, então, afeta negativamente parâmetros espermáticos. Ainda, o estudo dá pistas de possíveis novos papéis biológicos para a β -defensina SPAG11C em células imunológicas e não imunológicas no SNC e epidídimo em condição de homeostasia e inflamatória

Palavras-chave: Transtorno de estresse pós-traumático. Neuroinflamação. β -defensinas. Epidídimo. Fertilidade Masculina.

ABSTRACT

FREITAS, G A. **Evaluation of neuroinflammation and induced epididymitis in a posttraumatic stress disorder model:** role of β -defensin in inflammatory cell modulation. 2019. 120 p. Thesis (Ph. D. thesis in Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Individuals are exposed to stress develop a range of mental disorders, including posttraumatic stress disorder (PTSD), a debilitating condition usually in comorbidity with other psychiatric disorders and sexual dysfunction. In addition to psychiatric impairment, PTSD has been associated with dysregulation of innate immunity, among other metabolic and inflammatory factors. Although PTSD has been linked to a systemic inflammation condition, little is known about how its effects on cellular and molecular aspects of innate immunity in the central nervous system (CNS) and impact on the post-testicular environment (epididymis) and male fertility. In the present study, we aimed to evaluate the consequences of stress by social isolation (SI), which mimics in adult mice with the PTSD clinical condition, on cellular and molecular components of innate immunity in the CNS and epididymis. The specific aims were: 1) characterize the expression pattern of the β -defensin SPAG11C in the CNS of control mice; 2) evaluate the effects of SI the expression profile and regulation of innate immunity cellular and molecular components, including β -defensin SPAG11C on the CNS as well as plasma and tissue inflammatory mediators; and 3) evaluate the effects of SI the expression profile and regulation of innate immunity cellular and molecular components, including β -defensin SPAG11C on the epididymis and sperm parameters. Altogether, the results point out to new insights into the understanding of the role of innate immunity components in PTSD neuroinflammation and how this clinical condition impacts epididymal immunobiology leading to an epididymitis condition that negatively affects sperm parameters. Furthermore, the study potentially unravels new roles for the β -defensin SPAG11C in immune and non-immune cells in the CNS and epididymis in homeostasis and inflammatory conditions.

Keywords: Posttraumatic stress disorders. Neuroinflammation. β -defensin. Epididymis. Male fertility.

1 INTRODUÇÃO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é um transtorno de ansiedade que acomete o indivíduo que tenha sofrido ou sido exposto a um evento traumático, sendo caracterizado por um conjunto de sinais que compreendem a re-experiência persistente do trauma vivenciado. No momento, os tratamentos farmacológicos aprovados para TEPT, os inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS), têm uma eficácia limitada (~ 60% de resposta ao tratamento), havendo ainda a necessidade de biomarcadores que facilitem o diagnóstico e, também, permitam o monitoramento da eficácia de abordagens terapêuticas. Evidências crescentes sugerem que desbalanços na homeostasia de componentes imunológicos e inflamatórios tenham correlação com o desenvolvimento e a gravidade dos sintomas em pacientes com TEPT. No entanto, o papel desses componentes no desenvolvimento e manutenção dos sintomas de TEPT ainda não é claro; em parte pela inflamação ser um epifenômeno que pode também estar ligado as alterações metabólicas e comportamentais associadas a essa condição de estresse. De fato, a condição inflamatória sistêmica que acompanha o TEPT está potencialmente associada a comorbidades inflamatórias. As consequências do TEPT para a saúde reprodutiva e fertilidade masculina têm sido, no entanto, pouco exploradas.

O modelo experimental do isolamento social, que mimetiza em camundongos suíços adultos a condição clínica de TEPT, tem sido um instrumento importante nos últimos anos para avançar no melhor entendimento da biologia dessa condição clínica. No presente trabalho utilizamos esse modelo experimental para testar a hipótese de que componentes da imunidade inata, incluindo a β -defensina SPAG11C, tenham papel na dinâmica da disfunção inflamatória no TEPT. As consequências desse estresse emocional na inflamação sistêmica e na saúde reprodutiva, focando no estudo da biologia epididimária e parâmetros reprodutivos, também foram avaliadas. Apresentamos, a seguir, alguns tópicos com apoio da literatura relacionados com a temática deste trabalho.

1.1 Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT): aspectos gerais

Em geral, indivíduos em diferentes faixas etárias estão passíveis de vivenciar experiências traumáticas ao longo da vida. Entre esses, há os que mesmo com as adversidades, possuem a capacidade de se adaptar após uma experiência traumática.

No entanto, indivíduos mais susceptíveis podem desenvolver distúrbios psiquiátricos graves e que, se não tratados, com o tempo podem progredir e acarretar sofrimento físico e psicológico (BRESLAU et al. 2001; BRYANT, 2003; JAVIDI e YADOLLAHIE, 2012). Dentre essas condições clínicas destaca-se o TEPT, um dos transtornos psiquiátricos mais comumente diagnosticados, com taxa de prevalência variando entre 8% a 20% da população geral em vários países (KULKA et al. al., 1990; KANG et al., 2003; TAPIELIAN et al., 2008; BRESSAN et al., 2009; GREENE et al., 2016). No Brasil, apesar de poucos estudos na área, há relatos de prevalência variando entre 6,5% até 20,5% dependendo da população analisada (CUNHA e BORGES, 2013; RIBEIRO et al., 2013; LUZ et al., 2016; SILVA et al., 2019).

O TEPT é uma condição psiquiátrica debilitante comumente descrita como um "complexo efeito somático, cognitivo, afetivo e comportamental do trauma psicológico" (BOSCARINO, 2006; KEANE et al., 2006). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DMS-V), o TEPT é caracterizado por pensamentos intrusivos, pesadelos e *flashbacks* de eventos traumáticos passados, hipervigilância e distúrbios do sono, os quais levam a uma disfunção social, ocupacional e interpessoal considerável (GILL et al., 2009; SPEER et al., 2018). Além desse quadro clássico, os indivíduos com TEPT apresentam maior risco para o desenvolvimento de doenças crônicas, entre estas desregulações cardiovasculares, metabólicas, diabetes, doenças autoimunes e, ainda, mortalidade precoce (MELLON et al., 2018). Somado a fatores de estilo de vida (por exemplo, sedentarismo, obesidade, tabagismo e abuso de substâncias químicas e medicamentos), sabe-se que certos processos intrínsecos à fisiopatologia do TEPT são fatores de risco para o envelhecimento precoce, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e da função autonômica, alterações metabólicas e, ainda, inflamação (DEDERT et al., 2010, LOHR et al., 2015; MICHPOPOULOS et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

De fato, a literatura tem ressaltado que mudanças da homeostasia do sistema imunológico são mecanismos que favorecem a inflamação no TEPT (BLACK, 2006; DENNIS et al., 2016; WANG e YOUNG, 2016). Um estado pró-inflamatório de baixo grau prolongado em pacientes portadores de TEPT é considerado como um fator para um maior risco a doenças crônicas; há desbalanços na resposta do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo (SNA) frente ao estresse a que esses pacientes são submetidos ao longo da vida (**Figura 1**). Nessa condição há atenuação na resposta do sistema nervoso parassimpático (SNP) em conjunto com exacerbação da ativação

simpática (DASKALAKIS et al., 2013; DENNIS et al., 2016), eventos que são mantidos sob regulação do nervo vago (BLECHERT et al., 2007). Considerando que uma das funções do nervo vago é regular o sistema imunológico e, por consequência, a resposta inflamatória, o prejuízo da função vagal é apontado como sendo um dos fatores de risco limitantes do desfecho clínico do TEPT (para revisão ver GILL et al., 2009; MELLON et al., 2018).

Figura 1. Aspectos da neuroimunomodulação na fisiopatologia do TEPT.

A desregulação do eixo HPA está associada a alterações no controle do sistema imunológico que, levando a uma condição pró-inflamatória de baixo grau e que envolve participação do aumento de citocinas pró-inflamatórias liberadas por células do sistema imune inato periférico, como por exemplo macrófagos. Essas citocinas, por sua vez, atingem o SNC por fibras aferentes (por exemplo, nervo vago) ou via regiões circunventriculares da barreira hematoencefálica. No SNC, as citocinas participam de vias que alteram o metabolismo e ação de neurotransmissores e contribuem para a ativação do núcleo paraventricular (NPV) no hipotálamo com subsequente liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticóides (corticosterona em roedores). Esses eventos estão relacionados com a fisiopatologia de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo o TEPT.

Adicionalmente, alterações da atividade do eixo HPA também incluem mudanças da sinalização desencadeada por glicocorticóides que, por sua vez, também impactam a condição de baixo grau pró-inflamatório e crônico nesses pacientes (BAUER et al., 2010) (**Figura 1**). Nesse contexto há, por exemplo, estudo recente indicando a utilização da estimulação vagal no tratamento do TEPT, pois atenua os efeitos comportamentais que são frequentemente observados nesta condição, incluindo medo, ansiedade e comportamento agressivo (INTYRE, 2019). Portanto, além de um transtorno mental, o TEPT tem sido também definido como uma

condição inflamatória sistêmica de baixo grau (MELLON et al., 2018; SPEER et al., 2018).

Até o momento não existem evidências de como as células imunológicas do SNC e de tecidos periféricos atuam na integração neuroimunológica na condição inflamatória induzida pelo TEPT. Este aspecto foi um dos objetivos do presente trabalho. A seguir, aspectos das células do sistema imune inato do SNC e neuroimunomodulação são apresentados.

1.2 Aspectos da neuroimunomodulação mediada pelas células da glia no SNC

Atualmente, sabe-se que o SNC se comunica bidirecionalmente com o sistema imunológico; o controle fisiológico central da imunidade periférica ocorre por meio de sinalização humoral e da ativação direta de vias neuronais que incluem o eixo HPA e o SNA (AN et al., 2014). Fisiologicamente, o hipotálamo controla a liberação de citocinas pró-inflamatórias das células imunológicas, dentre elas, células T, monócitos e macrófagos, promovendo a liberação sistêmica de citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo, a interleucina (IL) 10 (CHAMORRO et al., 2012). Da mesma forma, a liberação de noradrenalina dos centros autônomos e órgãos periféricos (incluindo a medula adrenal, fígado e baço) induz um fenótipo anti-inflamatório constitutivo nas células imunes em circulação (MEISEL et al., 2005). O sistema imunológico, por sua vez, é responsável pelo desenvolvimento, vigilância e resposta ao dano no SNC. No cérebro em desenvolvimento, grande parte dos processos subjacentes à neurogênese e síntese de espinhas dendríticas é mediada por células imunes residentes (BESEDOVSKY e REY, 2007; BOULANGER, 2009). Posteriormente na idade adulta, as células imunológicas (residentes e circulantes) funcionam como guardiões primários do SNC e, como sentinelas, contribuem para a manutenção da homeostasia (CHAMORRO et al., 2012; OUSMAN e KUBES, 2012). Os mecanismos imunológicos são de fato responsáveis pela remodelação constante dos circuitos neurais, consolidação da memória, potencialização a longo prazo do hipocampo e neurogênese em resposta aos estímulos ambientais cotidianos (MEISEL et al., 2005; YIRMIYA e GOSHEN, 2011).

Atualmente é sabido que as células da glia, como micróglias e astrócitos, desempenham papéis importantes na neuromodulação em condições fisiológicas e na resolução de condições inflamatórias no encéfalo. Essas células, quando em seu

estado reativo também participam na progressão de vários distúrbios do SNC. Quando os astrócitos respondem a estímulos inflamatórios no SNC (fenômeno de gliose) há a astrogliose que envolve uma série de alterações moleculares e morfológicas nessas células. Mediadores inflamatórios liberados por micróglia, neurônios, oligodendrócitos, células endoteliais, leucócitos e, também nos próprios astrócitos, também tem um papel nesses eventos (FROST e LI, 2017). A principal mudança morfológica durante a astrogliose é a hipertrofia dos processos celulares da célula astrocítica (**Figura 2A**) pelo aumento da expressão de proteínas de filamentos intermediários, como vimentina e proteína ácida fibrilar glial (GFAP; WILHELMSSON et al., 2006; KAMPHUIS et al., 2012). Esse comportamento específico de astrócitos ativados com propriedades neurotóxicas, está presente no SNC de pacientes com transtornos neurodegenerativos (por exemplo, doença de Alzheimer, Huntington, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica) e autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla) (LIDDELOW et al., 2018).

As células microgliais, consideradas macrófagos residentes do SNC, são células sensoriais que funcionam como principais células efetoras imunes inatas neste tecido. São ativadas no SNC em resposta a infecção e estímulos inflamatórios e, similares aos astrócitos, liberam vários mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, levando a ativação de outras células imunológicas (**Figura 2B**). São células que também podem funcionar como apresentadoras de antígenos (KONAT et al., 2006) e, assim como macrófagos, apresentam dois estados de ativação M1 (ativado classicamente e que possui um perfil de liberação de mediadores pró-inflamatórios) e o fenótipo M2 (menos frequente e relativo a um estado de ativação anti-inflamatório) (HUANG e FENG, 2013; *Figura 2B*).

Com o intuito de explorar o perfil neuroinflamatório celular das micróglia e astrócitos induzido pelo TEPT, utilizamos o modelo de isolamento social em camundongos, descrito e justificado a seguir.

Figura 2. Representação esquemática de células da glia (microglia e astrócitos) em situação de homeostasia e em resposta a um estímulo neuroinflamatório.

(A) O fenômeno da astrogliose é caracterizado pelo aumento de astrócitos reativos, que apresentam alterações moleculares, incluindo: fenótipo inflamatório e hipertrofia de ramificações celulares. (B) Microglia possuem papéis duplos, mas opostos, na progressão das respostas inflamatórias no SNC. No estágio inicial da inflamação, as microglia são principalmente diferenciadas no fenótipo M2 neuroprotetor. Com o tempo, as microglia gradualmente se transformam no fenótipo M1. Figura adaptada de HUANG e FENG, 2013.

1.3 Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT): isolamento social como modelo experimental

O TEPT é uma neuropatologia complexa e debilitante, frequentemente com uma sobreposição de sintomas e em comorbidade com outros transtornos mentais, incluindo depressão, distúrbios de ansiedade, abuso de drogas e comportamento suicida. Em vista da heterogeneidade desta condição clínica, tem sido desafiador estabelecer um modelo animal apropriado que recapitule as várias anormalidades comportamentais e bioquímicas de um paciente com TEPT, com valor como estudo pré-clínico e, ainda, que satisfaça os critérios de validação do mesmo (TOROK et al., 2018). Nesse contexto, há diferentes modelos experimentais que foram propostos ao longo das últimas décadas os quais, recentemente, foram revisados por ASPESI e PINNA (2019), incluindo o de isolamento social de camundongos por 4-5 semanas, que será abordado no presente trabalho; alguns detalhes desses modelos são apresentados na **Figura 3**.

Como descrito por ASPESI e PINNA (2019), apesar de reproduzirem parcialmente a neurobiologia do TEPT, os modelos experimentais (**Figura 3**) têm sido instrumentais no melhor entendimento dessa condição clínica, inclusive quanto aos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patologia e que incluem o papel de neuroesteroides, mais especificamente da alopregnanolona (ALO), nas disfunções

neuroquímicas e comportamentais do TEPT.

A ALO é um potente modulador alostérico positivo do receptor GABA_A e, por esse mecanismo, regula o comportamento emocional (LOCCI e PINNA, 2017; ASPESI e PINNA, 2019). É sintetizada no SNC a partir de esteroides periféricos pela ação da 5 α -redutase tipo I, presente principalmente em neurônios glutamatérgicos corticolímbicos (DONG *et al.*, 2001, para revisão ver PINNA *et al.* 2019). Em pacientes com TEPT há uma correlação da redução da concentração de ALO no líquido cérebro espinhal com os sintomas de re-experiência e comorbidade de depressão (RASMUSSEN *et al.*, 2006). A melhora dos sintomas dos pacientes tratados com ISRS, tais como fluoxetina, geralmente é acompanhada pelo aumento da concentração de ALO no líquido cérebro espinhal (UZUNOVA *et al.*, 1998; ASPESI e PINNA, 2019).

Os modelos experimentais de TEPT revisados na **Figura 3**, incluindo o isolamento social, facilitaram o entendimento da correlação entre a alteração do comportamento emocional com a redução da expressão córtico-límbica da 5 α -RI que, por ser uma enzima limitante na rota de síntese de ALO, induz a redução da concentração desse neuroesteroide em áreas do SNC relevantes para a regulação do comportamento emocional (córtex frontal, hipocampo e amígdala basolateral; PIBIRI *et al.*, 2008; ASPESI e PINNA, 2019). A própria ALO, seus análogos ou agentes que estimulam sua síntese (como a fluoxetina e outros ISRSs), foram mostrados como efetivos para prevenir ou reverter as características fenotípicas associadas às mudanças neuroquímicas do isolamento social, indicando a adequação deste modelo como ensaio pré-clínico (PIBIRI *et al.*, 2008; ASPESI e PINNA, 2019).

Figura 3. Fenótipos comportamentais e neurobiológicos de modelos em roedores para mimetizar o TEPT.

Modelo TEPT	Estímulo Estressor	Fenótipo Comportamental	Disfunção CPF/Amg	Aumento do Feedback negativo ao eixo HPA	Sensibilidade aos ISRS	Marcadores inflamatórios plasma	Marcadores inflamatórios SNC
Estresse de Imobilização	Imobilização por 30-120 min	Depressão e Anedonia (Chiba et al. 2012; Xu et al. 2017)	+	+	+	Não Relatado	Não Relatado
Estresse Crônico Imprevisível	Exposição diária por 1-8 semanas a diferentes estressores (predador, privação de comida e água, superlotação, etc)	Evasão geral (Wakizono et al. 2017)	Não Relatado	+	+	+	+
Choque Inescapável	Choques elétricos (1-20 choques de 0.3-1.5 mA por 0.5-10 s)	Evasão geral, aumento do medo e déficit na extinção de medo (Toth e Neumann, 2013)	+	Não Relatado	+	+	+
Exposição ao Predador	Exposição direta ao predador ou ao cheiro do predador	Evasão geral, resposta de medo exagerado e déficit na extinção de medo (Seetharaman et al. 2010; Cohen et al. 2010)	+	+	-	-	+
Estresse Prolongado	3 estressores sucessivos: - Imobilização (2h) - Nado forçado (20min) - Éter (até perda consciência)	Evasão, medo induzido (Le Dorze e Gisquet-Vernier et al. 2016)	+	+	-	Não Relatado	+
Estresse de Derrota Social	Interação intruso-residente (5-21 dias consecutivos)	Evasão geral (Warren et al. 2013)	+	-	-	+	+
Isolamento Social	Isolamento Social (3-4 semanas em gaiolas individuais)	Evasão, agressão, medo contextual e extinção de medo prejudicado (Pinna et al. 2003)	+	+	+	Não Relatado	Não Relatado

Um resumo das principais características neurobiológicas relacionadas ao fenótipo PTSD para cada modelo animal. Os símbolos de mais (+) indicam fenótipos relatados para cada modelo de roedor de PTSD, os símbolos de menos (-) indicam que os resultados no fenótipo específico ainda não são claros ou os resultados variam entre os laboratórios. "Não relatado" indica que os fenótipos ainda não foram investigados. Um dos objetivos do presente trabalho foi investigar influência do IS nos marcadores inflamatórios plasmáticos e no SNC, respondendo as questões não relatadas em destaque na tabela. Amg: amígdala; SNC, sistema nervoso central; HPA, hipotálamo-hipófise-adrenal; CPF: córtex pré-frontal; ISRS: inibidores seletivos da recaptação de serotonina. (Figura adaptada de ASPESI e PINNA et al., 2019).

Ainda, camundongos em isolamento social apresentam resistência aos efeitos sedativos e ansiolíticos de fármacos benzodiazepínicos pela deficiência de expressão de subunidades do receptor GABA_A na região córtico-frontal (NIN et al., 2011a), mimetizando a condição clínica. As alterações no receptor de GABA_A é uma assinatura exclusiva nesses pacientes, o que diferencia o TEPT de outras desordens mentais (PINNA e IZUMI, 2018), e torna a terapia com benzodiazepínicos ineficiente no tratamento desses pacientes (BREMNER et al., 2000; GEUZE et al., 2008).

Apesar da conhecida relação entre inflamação e fisiopatologia do TEPT citadas anteriormente, o papel potencial de componentes da imunidade inata e marcadores

inflamatórios no diagnóstico, prevenção e tratamento da condição clínica de TEPT é uma área ainda muito pouco explorada nesses modelos experimentais. Estudos recentes de genômica funcional (transcriptoma e sequenciamento de RNA em larga escala, RNAseq) conduzidos em células do sangue periférico humano revelaram que parte dos genes e redes moleculares diferencialmente expressos ao longo do desenvolvimento e decurso clínico do TEPT são relacionados a imunidade inata e vias de inflamação (BREEN et al., 2015; MEHTA et al., 2018). Esses dados corroboram com relatos da presença de marcadores inflamatórios (citocinas, por exemplo) a nível sistêmico (plasma) e no SNC, que foram identificados em alguns modelos experimentais animais de TEPT (ASPESI e PINNA, 2019; **Figura 3**). **Curiosamente, esses aspectos ainda não foram explorados no modelo do isolamento social e que será foco de estudo no presente trabalho.**

1.4 TEPT e saúde reprodutiva do homem

Embora o TEPT afete crianças, jovens e homens adultos em idade reprodutiva, poucos estudos se concentraram na influência desse transtorno de ansiedade na saúde reprodutiva e fertilidade masculina. Dados clínicos associam TEPT à efeitos prejudiciais na função testicular, espermatogênese, contagem e qualidade de espermatozóides e libido do homem (ABU-MUSA et al., 2007; OBORNA et al., 2010; REN et al., 2010; VENTKATESH et al., 2011; AZENABOR et al., 2015; ELEZAJ et al., 2015; DURAIRAJANAYAGAM, 2018). No entanto, os mecanismos pelos quais o cenário inflamatório associado ao TEPT impactam a saúde reprodutiva masculina, ainda é pouco conhecido. O isolamento social também induz prejuízo da performance reprodutiva em roedores (COOKE et al., 2000), a qual tem sido associada com a regulação negativa da concentração de ALO (PINNA et al., 2006; Uphouse et al., 2014).

Mais de um terço dos homens inférteis com uma condição idiopática não são diagnosticados de forma adequada; embora apenas em parte desses casos clínicos possa ser atribuída às condições inflamatórias/infecciosas do trato reprodutivo masculino, a maioria dos pacientes apresentam condições inflamatórias ou subinflamatórias crônicas que geralmente são assintomáticas. Sabe-se que pacientes inférteis possuem maior risco de exibir problemas de saúde quando comparados com homens saudáveis, devido às doenças coexistentes que influenciam não apenas a fertilidade do homem, mas também na saúde em geral e expectativa de vida. Em vista

da crescente prevalência de TEPT na população em geral, estudos nessa temática são fundamentais para esclarecer o quanto o TEPT pode ser o fator primário para consequências negativas na saúde reprodutiva e fertilidade do homem. Esse conhecimento é especialmente relevante para ser investigado no ambiente pós-testicular, onde os espermatozoides amadurecem e adquirem a capacidade de fertilizar o óvulo. ***No presente trabalho utilizamos o modelo experimental pré-clínico de TEPT, pelo isolamento social, para avançarmos na correlação entre TEPT e comorbidade de saúde reprodutiva focando no epidídimo como ferramenta de estudo no ambiente pós-testicular.***

1.5 Epidídimo e seu papel na fertilidade masculina

Dentre os tecidos do trato reprodutor masculino alvo de alterações durante uma condição de estresse, o epidídimo é relevante pois possui um papel crítico para a maturação, transporte e proteção de espermatozoides contra patógenos e outras injúrias metabólicas não-infecciosas, e para o transporte e estocagem desses gametas anterior a ejaculação (ROBAIRE e HINTON, 2015; AVELLAR e HINTON, 2018).

Anatomicamente, o epidídimo está localizado no escroto, ao lado do testículo. Consiste de um longo túbulo simples, altamente convoluto, que liga os dúctulos eferentes ao ducto deferente. É formado por três compartimentos principais (epitélio, lúmen e interstício) cujas características dos arranjos morfológicos permitem a divisão do tecido epididimário em 4 regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) que anatomicamente são classificadas da região proximal a distal respectivamente (ROBAIRE e HINTON, 2015; ZHOU et al., 2018; ***Figura 4***).

Uma característica marcante do epidídimo é que cada uma das regiões apresenta septos que delimitam sub-regiões teciduais que apresentam padrões distintos de expressão gênica e atividade secretória e absorviva das células epiteliais; isso gera microambientes luminiais distintos que, gradativamente ao serem transportados ao longo do tecido, interagem com os espermatozoides promovendo sua maturação (ROBAIRE e HINTON, 2015; ZHOU et al., 2018; AVELLAR e HINTON, 2018).

O epitélio epididimário é do tipo pseudoestratificado sendo envolto por uma camada de músculo liso e pelo interstício e apresenta diferentes tipos celulares cuja abundância relativa e morfologia variam ao longo do tecido (REID e CLELAND, 1957).

Os principais tipos celulares presentes no epitélio do epidídimo são: células principais e células basais, presentes em todas as regiões epididimárias; células apicais e células estreitas, restritas ao segmento inicial; células claras, presentes na cabeça, corpo e cauda do epidídimo; e, células halo, que são células imunológicas intraepiteliais (ROBAIRE et al., 2006; **Figura 4A e B**).

Figura 4. Estrutura regionalizada e distribuição esquemática dos principais tipos de células no epidídimo do camundongo.

(A) O epidídimo do camundongo é geralmente dividido em quatro segmentos anômicos únicos: o segmento inicial, o caput, o corpo e a cauda. O segmento inicial é um túbulo frouxamente enrolado, com diâmetro largo e baixa concentração de espermatozoides. As células epiteliais neste segmento são alongadas e ciliadas. A cabeça é caracterizada por um diâmetro luminal estreito, enquanto o diâmetro luminal e a concentração de espermatozoides aumentam distalmente dentro do corpo e cauda do epidídimo. Diferentes tipos de células dentro desses segmentos são responsáveis pela criação de um microambiente luminal especializado que promove a maturação e armazenamento dos espermatozoides. (B) As células principais são mais abundantes ao longo de todo o comprimento do epidídimo e são responsáveis pela biossíntese e secreção de proteínas nos segmentos epididimários proximais. Além das células principais, as células claras são distribuídas esporadicamente por todo o epitélio dos segmentos da cabeça, corpo e cauda e são as principais responsáveis pela absorção seletiva dos componentes luminiais e pela regulação do pH luminal. Um conjunto de tipos de células adicionais foi descrito no epidídimo, incluindo células basais, células apicais, células halo, células estreitas (encontradas apenas no segmento inicial e na zona intermediária) e células imunológicas. Figura A e B adaptada de ZHOU et al., 2018. (C) Células imunológicas (fagócitos mononucleares) estão localizadas nas regiões intertubulares (células dendríticas) e intersticiais (predominantemente macrófagos). Figura C adaptada de DA SILVA e BARTON, 2016.

As células principais são as mais abundantes no epitélio epididimário, representando de 65% a 80% da população total de células epiteliais desse tecido. São responsáveis pela síntese, secreção e reabsorção de proteínas e transporte de água, eletrólitos e outras moléculas de baixo peso molecular presentes no compartimento luminal (ROBAIRE et al., 2006). A presença de junções apertadas (tight junctions) na porção luminal das células principais forma a barreira hemato-

epididimária, fundamental para a manutenção do microambiente luminal e proteção do espermatozoide (MITAL et al., 2011). As células basais possuem funções diversas, como proteção contra espécies reativas de oxigênio (HERMO, 1995), regulação da secreção das células principais via liberação de fatores parácrinos (CHEUNG et al., 2005) e acidificação luminal pela comunicação com células claras (SHUM et al., 2008, 2011). As células claras possuem atividade endocítica, removendo material particulado, como por exemplo, fragmentos de espermatozoides e proteínas do lúmen do epidídimo (HERMO et al., 1988). As células halo são linfócitos intra-epiteliais (SERRE e ROBAIRE, 1999), com funções ainda não esclarecidas. Adicionalmente, foram descritos redes de células mononucleares fagocíticas, dentre elas, células dendríticas, localizadas na porção basal do epitélio epididimário, e macrófagos, localizados no interstício epididimário. (DA SILVA et al., 2011; **Figura 4C**).

Dentre as células epididimárias acima descritas, no presente trabalho, focamos em dois tipos celulares específicos, que incluem:

(1) fagócitos mononucleares: representados por macrófagos e células dendríticas e participam de processos relacionados à tolerância imunogênica e defesa inata deste tecido. Em camundongos, ambas as células apresentam positividade ao marcador de fagócitos mononucleares F4/80, aqui utilizado; e (2) células epiteliais claras: por apresentarem função de regular o pH do luminal, em situações de desequilíbrio homeostático no epidídimo, mediado pela ação da VATPase, uma proteína vacuolar liberadora de prótons de H^+ , que se localiza no polo apical dessas células (SHUM et al., 2009; BRETON e BROWN, 2013). Por este motivo, a VATPase pode ser utilizada como um marcador de células claras (PIETREMENT et al., 2006).

Uma variedade de proteínas/peptídeos relacionadas a imunidade inata são expressos de forma abundante no epitélio e em outros tipos celulares no epidídimo (HALL et al., 2007). Entre esses há genes que expressam diferentes receptores do tipo Toll (incluindo TLR4 que responde a endotoxina LPS de bactérias Gram-negativas), proteínas antimicrobianas, entre elas as β -defensinas, e, ainda, mediadores inflamatórios, todos com concentração basal sob modulação androgênica nesse tecido (HALL et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; RIBEIRO et al., 2015a, ROBAIRE e HINTON, 2015). A contribuição desses componentes para a fisiologia do epidídimo e durante disfunções inflamatórias nesse tecido não é ainda bem conhecida. Sabe-se que células imunológicas epididimárias, como os macrófagos e células dendríticas, também possuem papel nesses eventos (DA SILVA et al. 2016; VOISIN

et al. 2018; SILVA et al., 2018). A hipótese é de que essas células imunológicas estão em direta associação com células não imunológicas epididimárias via comunicação célula-célula, mantendo a homeostasia tecidual. Seus papéis específicos em condições fisiopatológicas, no entanto, estão começando a emergir (AVELLAR et al., 2019).

Os vários peptídeos relacionados a imunidade inata epididimária são, na maioria, proteínas com papéis multifuncionais que vão desde a ação antimicrobiana, imunomodulação, até a promoção de fertilidade masculina, entre outros efeitos (SILVA et al, 2011; RIBEIRO et al. 2015). Esse também é o caso da β -defensina SPAG11C, objeto de estudo em nosso laboratório. Essa β -defensina tem sido relatada com papel na resposta inflamatória (RADHAKRISHNAN et al. 2009; FEI et al., 2012; DENADAI-SOUZA et al., 2017), fertilidade masculina (XU et al., 2010; SEMPLE e DORIN, 2012) e, mais recentemente, morfogênese epididimária (RIBEIRO et al., 2015; 2017). Em condições basais o epidídimo também expressa uma variedade de citocinas pró- e anti-inflamatórias e seus respectivos receptores, com funções que ainda estão sendo exploradas na literatura e pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2018; AVELLAR et al., 2019). Uma das hipóteses é que certas citocinas determinam um ambiente fisiológico que permite a função epididimária e maturação espermática que ocorre ao longo desse tecido. Esta hipótese é reforçada pela presença abundante desses mediadores, de origem testicular e epididimária, no fluido seminal de homens saudáveis (POLITCH et al., 2007). Outra hipótese é de que as citocinas epididimárias mantenham um estado de vigilância imunológica constante em condição controle para responder prontamente a estímulos de infecção/inflamação e, ao mesmo tempo, contribuir para o ambiente de tolerância imunológica seletiva necessária para a integridade e maturação do espermatozoide em trânsito nesse tecido (VOISIN et al., 2018). Assim, melhor entender a dinâmica de como esses efetores inflamatórios atuam no epidídimo pode trazer um melhor entendimento dos seus papéis em condições fisiopatológicas nesse tecido.

1.6 β -defensinas: componentes imunes inatos atuando na integração neuro-imuno-epididimária

O foco deste trabalho também incluiu o avanço nos estudos a respeito da correlação de componentes da imunidade inata com a condição de TEPT, utilizando

o isolamento como modelo experimental. Dentre esses componentes da imunidade inata focamos nas β -defensinas que, a seguir, serão detalhadas.

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas pertencentes ao sistema imune inato que fornecem resposta imediata frente aos patógenos (Wiesner e Vilcinskis, 2010), e são vistos como candidatos promissores para o desenvolvimento de novos antibióticos (GORDON et al., 2005; GUANÍ-GUERRA et al., 2010; MAHLAPUU et al., 2016). Dentre os AMPs estão as β -defensinas, um grupo evolutivamente conservado de peptídeos antimicrobianos e imunomoduladores catiônicos que são expressos em todos os mamíferos, incluindo roedores e humanos (SMET e CONTRERAS, 2005; TAYLOR, BARRAN e DORIN, 2007). As β -defensinas são uma família de proteínas de baixo peso molecular (em geral 4-5 kDa), codificadas por genes geralmente compostos por 2 exons, apresentando uma estrutura estável, de uma alfa-hélice e três folhas β pregueadas, contendo seis cisteínas ligadas por três pontes dissulfeto. Essas são características encontradas em β -defensinas tais como DEFB1 e DEFB2.

Algumas β -defensinas, como as codificadas pelo gene *SPAG11B* humano (*sperm-associated antigen 11B*; isoformas SPAG11C, SPAG11D e SPAG11E, também chamada de *BIN1B* no camundongo) e a β -defensina 126 (DEFB126) humana (ortóloga da DEFB22 de rato e camundongo), são exceções por serem proteínas mais longas (13-15 kDa), derivadas de estruturas gênicas com mais de 2 exons, contendo aminoácidos adicionais na região N-terminal ou no C-terminal quando comparadas às demais da família (RIBEIRO et al. 2012; **Figura 5**).

A sequência gênica e de aminoácidos da β -defensina SPAG11C humana é bastante conservada entre as espécies, incluindo *Macaca mulatta*, *Bos taurus*, *Mus musculus* e *Ratus norvegicus* (HAMIL et al., 2000; AVELLAR et al., 2004; AVELLAR et al., 2007; HALL et al., 2007; RIBEIRO et al., 2012). Em camundongos, modelo animal adotado no presente estudo, o gene *Spag11b*, que está localizado no cromossomo 8 codifica transcritos que são traduzidos nas isoformas da SPAG11C (YENUGU et al., 2006b; RIBEIRO et al., 2012); a organização gênica e a sequência primária de aminoácidos que a compõe está apresentado na **Figura 5**.

Figura 5. Representação da organização genômica e dos produtos proteicos do gene *SPAG11B*.

(A) Representação da organização genômica e produto proteico do gene humano e (B) de camundongos. O gene humano e de camundongos está localizado no cromossomo 8. E1 a E8 representam os exons e as linhas os introns do gene no humano. E1 a E3 representam os exons e as linhas representam os introns no camundongo. Os resíduos de cisteína do domínio de β-defensina estão destacados em amarelo. A posição dos aminoácidos e a massa molecular aproximada dos diferentes produtos de processamento proteolítico são indicadas. As sequências de aminoácidos foram extraídas do NCBI (National Center for Biotechnology Information): SPAG11C (Humano: NP_478110.1; Camundongo: NP_694755.1). Ferreira *et al.*, 2019; figura adaptada da dissertação de mestrado, dados não publicados.

As β-defensinas são importantes participantes da resposta de defesa inata do hospedeiro (BEISSWENGER e BALS, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2015; VALORE *et al.*, 1998). São encontradas em células epiteliais de diferentes tecidos periféricos, neutrófilos, algumas populações de macrófagos e células de Paneth do intestino delgado (HALL *et al.* 2007; RIBEIRO *et al.* 2012). No trato reprodutor masculino são expressas de forma abundante, particularmente no testículo e epidídimo. Por serem secretadas para o lúmen epididimário, são também encontradas na superfície dos espermatozoides e no ejaculado de diferentes espécies, indicando seu papel potencial na função espermática e fertilidade masculina (HALL *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2012, 2015). As β-defensinas podem ainda participar do controle de uma infecção ou resposta inflamatória a estímulos inflamatórios causados por diferentes estímulos (RIBEIRO *et al.*, 2012; 2015; DENADAI-SOUZA *et al.*, 2017; AVELLAR *et al.*, 2019). Em camundongos, a deleção parcial no cromossomo 8 de um *cluster* contendo nove genes de β-defensinas, incluindo o da *Spag11c*, levou a um prejuízo da função

espermática e um quadro de infertilidade, indicando o papel *in vivo* e a importância das β -defensinas na fertilidade do macho (ZHOU et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa ainda mostrou que, no epidídimo de ratos, a β -defensina SPAG11C está presente predominantemente em células mesenquimais do ducto de Wolff, o precursor embrionário do epidídimo, mudando para uma expressão mais confinada às células epiteliais epididimárias após o nascimento até a idade adulta, ampliando a visão de funções diferenciais desta β -defensina durante o período pré- e pós-natal no trato reprodutivo masculino (RIBEIRO et al. 2015a; 2015b; AVELLAR et al, 2019). Embora sejam consideradas proteínas multifuncionais, o exato mecanismo de ação pelo qual atuam e impacto na função epididimária ainda é um tópico a ser investigado.

β -defensinas atuam na defesa inata em vários tecidos periféricos (Hall et al., 2007, Ribeiro et al., 2012, 2015), contudo, os relatos de β -defensinas no sistema nervoso central são mais raros. As descobertas sobre a detecção dos transcritos de *Defb1* e *Defb2* no cérebro de ratos (cérebro total) e humanos adultos (plexo coroide e cérebro) foram relatadas anteriormente (NAKAYAMA et al., 1999; FROY et al., 2005). As β -defensinas têm o potencial de atuar como ativadores e moduladores da imunidade em astrócitos e micróglia. Ambos os tipos celulares expressam *hBD-1* e *hBD-2* *in vitro* (HAO et al., 2001 ; HARDER et al., 2000; MATHEWS et al., 1999; ZHAO et al., 1996). Mais recentemente, foi relatada a expressão gênica e a localização da *hBD-1* nas células epididimárias e plexo coroide, e em neurônios e astrócitos do hipocampo no cérebro humano (WILLIAMS et al., 2013). O padrão detalhado de distribuição no SNC, as funções neurofisiológicas e seus efeitos potenciais na modulação neuroinflamatória ainda não foram relatados. Por isso, neste estudo, investigamos a expressão e distribuição da β -defensina SPAG11C no sistema nervoso central em condições controle e após o estresse prolongado causado pelo modelo de IS e diferentes estímulos inflamatórios, incluindo o tratamento com LPS e castração.

1.7 Justificativa da hipótese do trabalho

Com base no exposto até aqui, hipotetizamos que a desregulação imunológica e consequente neuroinflamação característica do TEPT envolva a participação da β -defensina SPAG11C no SNC. Também hipotetizamos que a inflamação sistêmica que se segue na condição de TEPT tenha como comorbidade consequências no trato

reprodutor e fertilidade masculina. Assim, a inflamação sistêmica, crônica, que acompanha esta condição de estresse poderia ser um potencial fator de impacto sobre a fertilidade masculina. Para esses estudos utilizamos o modelo de isolamento social em camundongos para avaliar as consequências desse estresse crônico em componentes celulares e moleculares da imunidade inata (β -defensinas e mediadores inflamatórios) no SNC, plasma, epidídimo e parâmetros espermáticos.

6 CONCLUSÃO

Compreender as bases neurobiológicas do TEPT é fundamental para diagnosticar com precisão essa neuropatologia e oferecer opções de tratamento apropriadas aos pacientes. Os mecanismos pelos quais componentes da imunidade inata, incluindo a β -defensina SPAG11C, atuam no sistema nervoso central e no epidídimo podem contribuir para o entendimento da função dessas proteínas no TEPT e, também, nas repercussões dessa condição inflamatória instalada pelo estresse crônico sobre a fertilidade masculina. Nessa perspectiva nosso trabalho é inovador pois tem a chance de correlacionar, na vigência do estado inflamatório causado pelo modelo de IS aqui usado, o impacto dessa condição no trato reprodutor masculino, mais especificamente o epidídimo, no qual o acometimento inflamatório (epididimite) também gerou prejuízos em parâmetros espermáticos quantitativos e qualitativos. A integração dos resultados obtidos neste trabalho está esquematizada no resumo gráfico na **Figura 32**.

Figura 6. Resumo gráfico dos resultados e conclusões do presente trabalho.

Painel superior: alterações celulares observadas no SNC. **Painel central:** alterações observadas na concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias. **Painel inferior:** representação esquemática das alterações celulares no epidídimo e impacto do IS sobre os espermatozoides. Modelo proposto para integrar os eventos da participação de β -defensinas e outros componentes da imunidade inata (células e citocinas inflamatórias) no contexto do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) com base nos dados do presente trabalho utilizando o modelo pré-clínico do isolamento social (IS) que mimetizar, em camundongos, a condição clínica do TEPT.

REFERÊNCIAS

- ABU-MUSA, A.A.; NASSAR, A.H.; HANNOUN, A.B.; USTA, I.M. Effect of the Lebanese civil war on sperm parameters. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 6, p. 1579-1582, dez, 2007.
- AMOR, S.; PUENTES, F.; BAKER, D.; VAN DER VALK, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 129, n. 2, p. 154-169, fev, 2010.
- AVELLAR, M.C.W.; RIBEIRO, C.M.; SILVA, M.R.; SILVA, E.J.R. In search for new paradigms for epididymal health and disease: innate immunity, inflammatory mediators and steroid hormones. **Andrology**, v. 7, n. 5, p. 690-702, set, 2019.
- ASPESI, D. e PINNA, G. Animal models of post-traumatic stress disorder and novel treatment targets. **Behavioural Pharmacology**, 30:130–150, 2019.
- AZENABOR, A.; EKUN, A.O.; AKINLOYE, O. Impact of inflammation on male reproductive tract. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 16, nº. 3, p. 123-129, jul-set, 2015.
- BATTISTONE, M.A.; NAIR, A.V.; PERALTA, M.A.; BROWN, D.; BARTON, C.R.; LIBERMAN, R.N.; Breton, S. Extracellular adenosine stimulates vacuolar atpase–dependent proton secretion in medullary intercalated cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 2, p. 545-556, fev, 2018.
- BAUMEISTER, P.; LUO, S.; SKARNES, W.C.; SUI, G.; SETO, E.; SHI, Y., Lee, A.S. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 11, p. 4529-4540, jun, 2005.
- BEAUDOIN, G.M.; LEE, S.H.; SINGH, D.; YUAN, Y.; REICHARDT, L.F.; ARIKKATH, J. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. **Nat Protoc.**Sep;7(9):1741-54, 2012.
- BEISSWENGER, C.; BALS, R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. **Current Protein & Peptide Science**, v. 6, n. 3, p. 255-264, jun, 2005.
- BESSIS, A.; BÉCHADE, C.; BERNARD, D. ROUMIER, A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. **Glia**, v. 55, n. 3, p. 233-238, fev, 2007.
- BICK, R.J.; POINDEXTER, B.J.; BUJA, L.M.; LAWYER, C.H.; MILNER, S.M.; BHAT, S. Nuclear localization of HBD-1 in human keratinocytes. **Journal of Burns and Wounds**, v. 7, n. e3, ago, 2007.
- BLACK, P.H. The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 4, p. 879-891, jun, 2006.

BODALEO, F.J.; MONTENEGRO-VEGANAS, C.; HENRIQUEZ, D.R.; COURTZ, F.A.; GONZALEZ-BILLAULT, C. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)-deficient neurons show structural presynaptic deficiencies in vitro and altered presynaptic physiology. **Scientific Reports**. 2016

BOSCARINO, J.A. External-cause mortality after psychologic trauma: the effects of stress exposure and predisposition. **Comprehensive Psychiatry**, v. 47, n. 6, p. 503-514, nov-dez, 2006.

BREEN, M.S.; MAIHOFFER, A.X.; GLATT, S.J.; TYLEE, D.S.; CHANDLER, S.D.; TSUANG, M.T.; RISBROUGH, V.B.; *et al.* Gene networks specific for innate immunity define post-traumatic stress disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 12, p. 1538-1545, dez, 2015.

BRETON, S.; BROWN, D. Regulation of luminal acidification by the V-ATPase. **Physiology**, v. 28, n. 5, p. 318-329, set, 2013.

BREWER, G.J.; TORRICELLI, J.R.; Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. **Nature Protocols**, Vol 2, nº 6, 2007.

BRUUNSGAARD, H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 4, p. 819-835, out, 2005.

CALLE, M.C.; FERNANDEZ, M.L. Inflammation and type 2 diabetes. **Diabetes and Metabolism**, v. 38, n. 3, p.183-191, jun, 2012.

CATANIA, A.; COLOMBO, G.; ROSSI, C.; CARLIN, A.; SORDI, A.; LONATI, C.; TURCATTI, F.; *et al.* Antimicrobial properties of α -MSH and related synthetic melanocortins. **The Scientific World Journal**, v. 2, n. 6, p. 1241-1246, out, 2006.

CHEN, Z., JALABI, W., SHPARGEL, K.B., FARABAUGH, K.T., DUTTA, R., YIN, X., KIDD, G.J., *et al.* Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 34, p.11706–11715, ago, 2012.

CUNHA, M.P.; BORGES, L.M. Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) na infância e na adolescência e sua relação com a violência familiar. **Bol. Acad. Paulista de Psicologia**, São Paulo, Brasil - V. 33, no 85, p. 312-329, 2013.

CORNWALL, G.A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p.213-227, mar-abr, 2009.

DAGINAKATTE, G.C.; GADZINSKI, A.; EMNETT, R.J.; STARK, J.L.; GONZALES, E.R.; YAN, P.; LEE J-M.; *et al.* Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 261-267, mar, 2008.

DA SILVA, N.; CORTEZ-RETAMOZO, V.; REINECKER, H.C.; WILDGRUBER, M.; HILL, E.; BROWN, D.; SWIRSKI, FK.; *et al.* A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. **Reproduction**, v. 141, n. 5, p. 653-663, mai, 2011.

DA SILVA, N.; SHUM, W.W.C.; BRETON, S. Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 476-482, jul, 2007.

DA SILVA, N.; SHUM, W.W.C.; EL-ANNAN, J.; SMITH, P.J.S.; PAUNESCO, T.G.; MCKEE, M.; SMITH, P.J.S.; *et al.* Relocalization of the V-ATPase B2 subunit to the apical membrane of epididymal clear cells of mice deficient in the B1 subunit. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 1, p. c199-210, jul, 2007.

DA SILVA, N.; SMITH, T. Exploring the role of mononuclear phagocytes in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 591-594, jul-ago, 2015.

DEDERT, E.A.; CALHOUN, P.S.; WATKINS, L.L.; SHERWOOD, A.; BECKHAM, J.C. Posttraumatic stress disorder, cardiovascular, and metabolic disease: A review of the evidence. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 34, n. 6, p. 730-737, out, 2006.

DENADAI-SOUZA, A.; MARTIN, L.; DE PAULA, M.A.V.; DE AVELLAR, M.C.W.; MUSCARÁ, M.N.; VERGNOLLE, N.; CENAC, N. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 6, p. 1848-1858, jun, 2012.

DENADAI-SOUZA, A.; RIBEIRO, C.M.; ROLLAND, C.; THOUARD, A.; DERAISON, C.; SCAVONE, C.; GONZALEZ-DUNIA, D.; *et al.* Effect of tryptase inhibition on joint inflammation: a pharmacological and lentivirus-mediated gene transfer study. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1276, jun, 2017.

DENNIS, P.A.; WEINBERG, J.B.; CALHOUN, P.S.; WATKINS, L.L.; SHERWOOD, A.; DENNIS, M.F.; BECKHAM, J.C. An investigation of vago-regulatory and health-behavior accounts for increased inflammation in posttraumatic stress disorder. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 83, n. 1, p. 33-39, abr, 2016.

DE ANDRADE, S.F.; OLIVA, S.U.; KLINEFELTER, G.R.; KEMPINAS, W.D.G. Epididymis-specific pathologic disorders in rats exposed to gossypol from weaning through puberty. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 6, p. 730-737, out, 2006.

DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. **Biotchenology Letters**, v. 27, n. 18, p. 1337-134, set, 2005.

DUNN, K.W.; KAMOCKA, M.M.; MCDONALD, J.H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. **Am J Physiol Cell Physiol**, 300: C723-C742, 2011.

ELEZAJ, S.; GASHI, Z.; ZEQUIRAJ, A.; GRABANICA, D.; SHLLAKU, A.; GRUDA, B.; MUSAJ, V. Treatment of infertility in men with Post-traumatic Stress Disorder (PTSD) with the method of intrauterine insemination. **Medical Archives**, v. 69, n. 5, p. 327-330, out, 2015.

EIDE, L.; MCMURRAY, T.; Culture of adult mouse neurons. **BioTechniques**, 38:99-104, January, 2005.

FEI, Z.; HU, S.; XIAO, L.; ZHOU, J.; DIAO, H.; YU, H.; FANG, S; *et al.* MBin1b transgenic mice show enhanced resistance to epididymal infection by bacteria challenge. **Genes and Immunity**, v. 13, n. 6, p. 445-451, set, 2012.

FERREIRA, L.G.A. Regulação androgênica, atividade biológica e sinalização celular de β -defensinas na morfogênese do epidídimo. 2019. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2019.

FORBES, D.; PARLOW, R.; CREAMER, M.; ALLEN, N.; MCHUGH, T.; HOPWOOD, M. Mechanisms of anger and treatment outcome in combat veterans with posttraumatic stress disorder. **Journal of Traumatic Stress**, v. 21, n. 2, p. 142-149, abr, 2008.

FROY, O.; HANANEL, A.; CHAPNIK, N.; MADAR, Z. Differential expression of rat beta-defensins. **IUBMB Life**, v. 57, n. 1, p. 41-43, jan, 2005.

FULLER, A.D.; VAN ELDIK, L.J. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 246-256, dec, 2008.

GILL, J.M.; SALIGAN, L.; WOODS, S.; PAGE, G. PTSD is associated with an excess of inflammatory immune activities. **Perspectives in Psychiatric Care**, v. 45, n. 4, p. 262-27, out, 2009.

HALL, S.H.; YENUGU, S.; RADHAKRISHNAN, Y.; AVELLAR, M.C.W.; PETRUSZ, P.; FRENCH, F.S. Characterization and functions of beta defensins in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 453-462, jul, 2007.

HAO, H.N.; ZHAO, J.; LOTOCZKY, G.; GREVER, W.E.; LYMAN, W.D. Induction of human β -defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, n. 4, p. 1027-1035, mai, 2001.

HARDER, J.; BARTELS, J.; CHRISTOPHERS, E.; SCHRÖDER, J.M. A peptide antibiotic from human skin. **Nature**, v. 387, n. 861, jun, 1997.

HEDGER, M.P.; HALES, D.B. Immunophysiology of the male reproductive tract. *In*: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3ª Edição. Estados Unidos da America: Academic Press, 2006. p. 1195-1286.

HUANG, H.; WANG, L.; CAO, M.; MARSHALL, C.; GAO, J.; XIAO, N.; HU, G.; *et al.* Isolation Housing Exacerbates Alzheimer's Disease-Like Pathophysiology in Aged APP/PS1 Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 7, p. pyu116, jan, 2015.

ISHISAKA, M.; KUDO, T.; SHIMAZAWA, M.; KAKEFUDA, K.; OYAGI, A.; HYAKKOKU, K.; TSURUME, K.; *et al.* Restraint-Induced Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes in the Mouse Brain. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 10-16, jan, 2011.

JANEWAY, C.A.JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216, oct, 2002.

JELINSKY, S.A.; TURNER, T.T.; BANG, H.J.; FINGER, J.N.; SOLARZ, M.K.; WILSON, E.; BROWN, E.L.; KOPF, G.S.; JOHNSTON, D.S. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. **Biol Reprod.** Apr;76(4):561-70, 2007.

JOHANSON, C.; MCMILLAN, P.; TAVARES, R.; SPANGENBERGER, A.; DUNCAN, J.A.; SILVERBERG, G.; STOPA, E. Homeostatic capabilities of the choroid plexus epithelium in Alzheimer's disease. **Cerebrospinal Fluid Research**, v. 1, n. 3, dec, 2004.

KAMPHUIS, W.; MAMBER, C.; MOETON, M.; KOOIJMAN, L.; SLUIJS, J.A.; JANSEN, A.H.; VERVEER, M.; *et al.* GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42823, ago, 2012.

KEMPINAS, W.D.G.; KLINEFELTER, G.R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. e979114, mai-aug, 2014.

KREUZ, M.L.E. Suppression of Plasma Testosterone Levels and Psychological Stress. **Archives of General Psychiatry**, v. 26, n. 5, p. 479-482, mai, 1972.

LIDDELOW, S.A.; GUTTENPLAN, K.A.; CLARKE, L.E.; BENNETT, F.C.; BOHLEN, C.J.; SCHIRMER, L.; BENNETT, M.M.; *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481-487, jan, 2017.

MATHEWS, M.; JIA, H.P.; GUTHMILLER, J.M.; LOSH, G.; GRAHAM, S.; JOHNSON, G.K.; TACK, B.F. Production of β -Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. **Infection and Immunology**, v. 67, n. 6, p. 2740-2745, jun, 1999.

MELLON, S.H.; GAUTAM, A.; HAMMAMIEH, R.; JETT, M.; WOLKOWITZ, O.M. Metabolism, Metabolomics and Inflammation in Posttraumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 10, p. 866-875, mai, 2018.

MENDES, F.R.; HAMAMURA, M.; QUEIRÓZ, D.B.; PORTO, C.S.; AVELLAR, M.C. Effects of androgen manipulation on alpha1-adrenoceptor subtypes in the rat seminal vesicle. **Life Science**, v. 75, n. 12, p. 1449-1463, 2004.

MEYER, J.E.; BEIER, U.H.; GÖRÖGH, T.; SCHREIBER, S.; BECK, C.; MAUNE, S. Defensin and chemokine expression patterns in the palatine tonsil: a model of their local interaction. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 263, n. 4, p. 319-316, abr, 2006.

NAKAYAMA, K.; OKAMURA, N.; ARAI, H.; SEKIZAWA, K.; SASAKI, H. Expression of human β -defensin-1 in the choroid plexus. **Annals of Neurology**, 45, v. 45, n. 5, p. 685, mai, 1999.

NASH, B.; THOMSON, C.E.; LININGTON, C.; ARTHUR, A.T.; McCLURE, J.D.; McBRIDE, M.W.; BARNETT, S.C. Functional duality of astrocytes in myelination. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 37, p. 13028-13038, sep, 2011.

PASTOR-SOLER, N.; TYSZKOWSKI, R.; BAGNIS, C.; MCKEE, M.; VAN HOEK, A.; SABOLIC, I.; BROWN, D. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 2, p. 384-393, ago, 2001.

PELOSI, P. Novas proteínas de interação da SPAG11B/C: identificação, expressão celular e regulação androgênica no epidídimo. 2013. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

PETRELLI, F.; PUCCI, L.; BEZZI, P. Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. 1, fev, 2016.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, mai, 2001.

PHAM, K.; PAL, R.; QU, Y.; LIU, X.; YU, H.; SHIAO, S.L.; WANG, X.; *et al.* Nuclear glutaredoxin 3 is critical for protection against oxidative stress-induced cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 85, n. 1, p. 197-206, ago, 2015.

PIBIRI, F.; NELSON, M.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E.; PINNA, G. Decreased corticolimbic allopregnanolone expression during social isolation enhances contextual fear: a model relevant for posttraumatic stress disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5567-5572, abr, 2008.

PIETREMENT, C.; SUN-WADA, G.H.; DA SILVA, N.; MCKEE, M.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; FUTAI, M.; *et al.* Distinct Expression Patterns of Different Subunit Isoforms of the V-ATPase in the Rat Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 1, p. 185-194, jan, 2006.

PINNA, G.; AGIS-BALBOA, R.C.; PIBIRI, F.; NELSON, M.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Neurosteroid Biosynthesis Regulates Sexually Dimorphic Fear and Aggressive Behavior in Mice. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 10, p. 1190-2007, out, 2008.

PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 3, p. 362-372, jun, 2006.

PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. SSRIs act as Selective Brain Steroidogenic Stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 24-30, fev, 2009.

PINNA, G.; DONG, E.; MATSUMOTO, K.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 4, p. 2035-2040, fev, 2003.

RADHAKRISHNAN, Y.; HAMIL, K.G.; TAN, J.A.; GROSSMAN, G.; PETRUSZ, P.; HALL, S.H.; FRENCH, F.S. Novel partners of SPAG11B isoform D in the human male reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 4, p. 647-656, out, 2009.

RANSOHOFF, R.M.; BROWN, M.A. Innate immunity in the central nervous system. **The Journal of Clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1164-1171, abr, 2012.

RANSOHOFF, R.M.; HAMILTON, T.A.; TANI, M.; STOLER, M.H.; SHICK, H.E.; MAJOR, J.A.; ESTES, M.L.; *et al.* Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/ MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. **FASEB Journal**, v. 7, n. 6, p. 592-600, abr, 1993.

RIBEIRO, C.; ROMANO, R.; AVELLAR, M. Beta-defensins in the epididymis: clues to multifunctional roles. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 751-759, abr, 2012.

RIBEIRO, C.; SILVA, E.; HINTON, B.; AVELLAR, M.C.W. β -Defensins and the Epididymis: Contrasting Influences of Prenatal, Postnatal, and Adult Scenarios. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 323-328, mar-abr, 2016.

RIBEIRO, C.M.; FERREIRA, L.G.A.; THIMOTEO, D.S.; SMITH, L.B.; HINTON, B.T.; AVELLAR, M.C.W. Novel androgen-induced activity of an antimicrobial β -defensin: Regulation of Wolffian duct morphogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 442, n. 1, p. 142-152, fev, 2017.

RIBEIRO, C.M.; QUEIRÓZ, D.B.C.; PATRÃO, M.T.C.C.; DENADAI-SOUZA, A.; ROMANO, R.M.; SILVA, E.J.R.; AVELLAR, M.C.W. Dynamic changes in the spatio-temporal expression of the β -defensin SPAG11C in the developing rat epididymis and its regulation by androgens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 404, n. 1, p. 141-150, mar, 2015.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. The Epididymis. *In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4ª Edição. Estados Unidos da America: Academic Press, 2015. p. 691-771.

ROBAIRE, B.; SEENUNDUN, S.; HAMZEH, M.; LAMOUR, S.A. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 545-553, jul, 2007.

RUEDEN, C.T.; SCHINDELIN, J.; HINER, M.C. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, nov, 2017.

SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; MCEVEN, B. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *neuroendocrinology of stress and aging*. **Endocrine Reviews**, v. 7, n. 3, p. 284-301, ago, 1986.

SEMPLE, F.; DORIN, J.R. β -defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? **Journal of Innate Immunity**, v. 4, n. 4, p. 337-348, mar, 2012.

SFAKIS, L.; KAMALDINOV, T.; LARSEN, M.; CASTRACANE, J.; KHMALADZE, A. Quantification of Confocal Images Using LabVIEW for Tissue Engineering Applications. **Tissue Engineering**, Volume 22, Number 11, 2016.

SHUM, W.W.C.; DA SILVA, N.; BROWN, D.; BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. Pt 11, p. 1753-1761, jun, 2009.

SILVA, E.J.R.; RIBEIRO, C.M.; MIRIM, A.F.M.; SILVA, A.A.S.; ROMANO, R.M.; HALLAK, J.; AVELLAR, M.C.W. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid differentially modulate epididymal cytokine and chemokine profiles and sperm parameters in experimental acute epididymitis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, jan, 2018.

SPEER, K.; UPTON, D.; SEMPLE, S.; MCKUNE, A. Systemic low-grade inflammation in post-traumatic stress disorder: a systematic review. **Journal of Inflammation Research**, v. 11, n. 1, p. 111-121, mar, 2018.

SPYRIDAKI, E.C.; SIMOS, P.; AVGOUSTINAKI, P.D.; DERMITZAKI, E.; VENIHAKI, M.; BARDOS, A.N.; MARGIORIS, A.N. The association between obesity and fluid intelligence impairment is mediated by chronic low-grade inflammation. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 10, p. 1724-1734, nov, 2014.

STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNELL, N.A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 563-581, abr, 1999.

SU, Y.; ZHANG, K.; SCHLUESENER, H.J. Antimicrobial Peptides in the Brain. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 58, n. 5, p. 365-377, out, 2010.

SUZUMURA, A. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. **Current Protein & Peptide Science**, v. 14, n. 1, p. 26-20, fev, 2013.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, mar, 2010.

TAVARES, G.; MARTINS M.; CORREA, S.C.; SARDINHA, V.M.; GUERRA-GOMES, S.; NEVES, S.P; MARQUES, F.; SOUSA, NUNO.; OLIVEIRA, J.F. Employing an open-source tool to assess astrocyte tridimensional structure. **Brain Struct Funct**, 222:1989-1999, 2017.

TAYLOR, K., BARRAN, P. E., e DORIN, J. R. Review Review Structure–Activity Relationships in β -Defensin Peptides Structure–Activity Relationships in β -Defensin. **Peptides**. 90(1), 1-7, v. 7, n. 3, p. 284-301, ago, 2007.

TRASLER, J.M.; HERMO, L.; ROBAIRE, B. Morphological Changes in the Testis and Epididymis of Rats Treated with Cyclophosphamide: A Quantitative Approach. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 463-479, mar, 1988.

VALORE, E.V.; PARK, C.H.; QUAYLE, A.J.; WILES, K. R.; MCCRAY, P.B.; GANZ, T. Human β -defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 8, p. 284-301, abr, 1998.

VAN WETERING, S.; MANNESSE-LAZEROMS, S.P.G.; VAN STERKENBURG, M.A.; HIEMSTRA, P.S. Neutrophil defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone. **Inflammation Research**, v. 51, n. 1, p. 8-15, jan, 2002.

VOISIN, A.; WHITFIELD, M.; DAMON-SOUBEYRAND, C.; GOUBELY, C.; HENRY-BERGER, J.; SAEZ, F.; KOCER, A.; *et al.* Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: unexpected populations arise. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 126, n. 1, p. 11-17, abr, 2018.

WANG, L.; MILLION, M.; RIVIER, J.; RIVIER, C.; CRAFT, N.; STENZEL-POORE, M.P.; TACHÉ, Y. CRF receptor antagonist astressin-B reverses and prevents alopecia in CRF over-expressing mice. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16377, fev, 2011.

WANG, Z.; YOUNG, M.R.I. PTSD, a disorder with an immunological component. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 1, jun, 2016.

WILHELMSSON, U.; BUSHONG, E.A.; PRICE, D.L.; SMARR, B.L.; PHUNG, V.; TERADA, M.; ELLISMAN, M.H.; *et al.* Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 103, n. 46, p. 17513-17518, nov, 2006.

WILLIAMS, W.M. TORRES, S.; SIEDLAK, S.L.; CASTELLANI, R.J.; PERRY, G.; SMITH, M.A.; ZHU, X. Antimicrobial peptide β -defensin-1 expression is

upregulated in Alzheimer's brain. **Journal of Neuroinflammation.**, v. 10, n. 1, out, 2013.

XU, W.; ZHANG, X.; CHEN, W.; FOK, K.L.; ROWLANDS, D.K.; CHUI, Y.L.; CHAN, H.C. Immunization with Bin1b decreases sperm motility with compromised fertility in rats. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 952-958.e1, fev, 2010.

YANG, D.; CHERTOV, O.; BYKOVSKAIA, S.N.; CHEN, Q.; BUFFO, M.J.; SHOGAN, J.; ANDERSON, M.; *et al.* β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 525-928, out, 1999.

ZAMANIAN, J.L.; XU, L.; FOO, L.C.; NOURI, N.; ZHOU, L.; GIFFARD, R.G.; BARRES, B.A. Genomic analysis of reactive astrogliosis. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 18, p. 6391-6410, mai, 2012.

ZHAO, C.; WANG, I.; LEHRER, R.I. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. **FESB Letters**, v. 396, n. 2-3, p. 319-22, nov, 1996.