

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Participação da via P2X7-Inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento das  
consequências comportamentais do estresse.**

**Aline Lulho Roncalho**

**Ribeirão Preto - SP**

**2022**

Aline Lulho Roncalho

Participação da via P2X7-Inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto – SP

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL E/OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Roncalho, Aline Lulho

Participação da via P2X7-Inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse.

135 folhas – versão digital

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) –  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

1. Receptor P2X7. 2. Inflamassoma NLRP3. 3. Desamparo Aprendido.  
4. Depressão. 5. Estresse.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Lulho Roncalho

**Participação da via P2X7-Inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento das  
consequências comportamentais do estresse.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em \_\_/\_\_/2022

### Banca Examinadora

Presidente: Profa. Dra. Sâmia R.L. Joca  
(membro não votante)  
Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: \_\_\_\_\_

Membro 1:  
Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Membro 2:  
Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Membro 3:  
Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

“ Então é hora de recomeçar tudo outra vez, sem ilusão e sem pressa, mas com a teimosia do inseto que busca um caminho no terremoto. ”

Carlos Drummond de Andrade, 1968

Dedico este trabalho à minha mãe Angela, que sempre se dedicou para que eu pudesse trilhar com liberdade os caminhos que escolhi e à minha vó Rosa (*in memoriam*) que foi a minha base de disciplina e educação na primeira infância.

## **Agradecimentos**

À minha mãe Angela e à minha irmã Adriana pelo apoio incondicional.

Ao meu namorado Rodrigo e aos nossos cachorros (Titu, Tereza, Ozzy e Lola) pelo companheirismo na jornada da vida.

À minha cunhada Amanda pela troca tão sincera.

À Letícia e Pedro, meus amigos de laboratório e de vida, pelas conversas e pelos conselhos.

Ao meu psicólogo Gabriel, cujo trabalho foi essencial para a finalização deste ciclo.

Aos professores que convivi durante a minha jornada na pós-graduação, por todo o ensinamento transmitido em aulas, seminários e workshops. Aos professores Riccardo Lacchini e Silvana Chiavegatto e à Juliana Corrêa pela colaboração nos experimentos moleculares

À Gislaine, secretária do programa de farmacologia, que sempre me atendeu com dedicação, me ajudando e auxiliando principalmente em urgências.

Aos amigos e colegas de pós-graduação que compartilham da jornada tão agri-doce.

À equipe do Genomas Raros do Hospital Israelita Albert Einstein, em especial à Gabriela e Ana Flávia, que me cobriram em diversos momentos para que eu pudesse finalizar a escrita deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, que aceitaram investir tempo e energia para discutir e enriquecer o presente trabalho.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelos recursos financeiros, indispensáveis à realização deste trabalho.

## RESUMO

RONCALHO, A.L. **Participação da via P2X7-Inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2022

A depressão é um distúrbio multifatorial e de alta prevalência, com sérias consequências ao indivíduo deprimido e à sociedade. Os estudos acerca da neurobiologia da depressão objetivam a busca de novos fármacos antidepressivos e o entendimento das bases neurais e mecanismos celulares e moleculares subjacentes à patologia. Nesse sentido, a interação entre os receptores P2X7 e inflamassoma NLRP3 parecem modular as consequências comportamentais da exposição ao estresse e a resposta a fármacos antidepressivos. Dessa maneira, o presente trabalho teve como hipótese que o tratamento com antagonista purinérgico seria capaz de prevenir o desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos e que essa prevenção envolveria o controle da ativação da cascata NLRP3/caspase-1/IL-1 $\beta$ . De maneira complementar, hipotetizamos também que o tratamento com o inibidor da cascata de inflamassoma NLRP3 seria capaz de prevenir os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse e que este efeito teria o envolvimento de componentes do sistema purinérgico. Os resultados mostraram que o tratamento repetido com fluoxetina (10mg/kg) foi capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo em parte dos animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido, sendo os níveis de RNAm de NLRP3 no HPCd destes animais menores do que os animais não responsivos ao tratamento, indicando que a supressão da via P2X7-NLRP3 pode fazer parte do mecanismo de ação da fluoxetina. O tratamento com BBG (antagonista P2X7), o tratamento com MCC950 (inibidor de inflamassoma) e o tratamento com cetamina não foram capazes de reduzir o número de falhas nos animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido. De maneira semelhante, a associação de BBG com fluoxetina e de cetamina com fluoxetina também não apresentou efeito tipo-antidepressivo nos animais. A associação de fluoxetina com inibidor de inflamassoma MCC950 foi capaz de reduzir o número de falhas dos animais submetidos ao desamparo aprendido, constituindo uma estratégia farmacológica interessante para reverter as consequências comportamentais do estresse.

**Palavras-chave:** Receptor P2X7, inflamassoma NLRP3, desamparo aprendido, depressão, estresse.

## **ABSTRACT**

RONCALHO, A.L. **Participation of the P2X7-Inflammasome NLRP3 pathway in the development of behavioral consequences of stress.** Thesis (Ph.D.) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo – Ribeirão Preto, 2022

Depression is a multifactorial and highly prevalent disorder, with serious consequences for depressed individuals and society. Studies on the neurobiology of depression aim to search for new antidepressant drugs and to understand the neural bases and cellular and molecular mechanisms underlying the pathology. In this sense, the interaction between P2X7 receptors and NLRP3 inflammasome seems to modulate the behavioral consequences of stress exposure and the response to antidepressant drugs. Thus, the present study hypothesized that treatment with a purinergic antagonist would be able to prevent the development of depressive-like behaviors and that this prevention would involve controlling the activation of the NLRP3/caspase-1/IL-1 $\beta$  cascade. In a complementary way, we also hypothesized that treatment with the NLRP3 inflammasome cascade inhibitor would be able to prevent the behavioral effects induced by stress and that this effect would involve components of the purinergic system. The results showed that the repeated treatment with fluoxetine (10mg/kg) was able to induce an antidepressant-like effect in part of the animals submitted to the learned helplessness model, with the levels of NLRP3 mRNA in the HPCd of these animals being lower than in the non-responsive animals, indicating that suppression of the P2X7-NLRP3 pathway may be part of fluoxetine's mechanism of action. Treatment with BBG (P2X7 antagonist), treatment with MCC950 (inflammasome inhibitor), and treatment with ketamine was not able to reduce the number of failures in animals subjected to the learned helplessness model. Similarly, the association of BBG with fluoxetine and ketamine with fluoxetine also did not show an antidepressant-like effect in the animals. The association of fluoxetine with MCC950 (inflammasome inhibitor) was able to reduce the number of failures in animals subjected to learned helplessness, being an interesting pharmacological strategy to reverse the behavioral consequences of stress.

**Keyword:** P2X7 receptor, NLRP3 inflammasome, learned helplessness, depression, stress.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Critérios Diagnósticos para Transtorno Depressivo Maior, de acordo com DSM-5.....	16
<b>Tabela 2:</b> Receptores purinérgicos.....	31
<b>Figura 1:</b> Representação dos componentes do inflamassoma NLRP3.....	35
<b>Figura 2:</b> Ativação do inflamassoma NLRP3 mediada por receptores P2X7.....	37
<b>Figura 3:</b> Representação ilustrativa de uma caixa de esQUIVA, utilizada para induzir o desamparo aprendido nos animais.....	41
<b>Tabela 3:</b> sequência dos primers utilizados para quantificação gênica.....	43
<b>Figura 4:</b> Protocolo experimental para avaliar o efeito do tratamento agudo e repetido com fluoxetina.....	44
<b>Tabela 4:</b> Critérios de classificação dos animais de acordo com o grupo de tratamento, estresse e número de falhas.....	46
<b>Figura 5:</b> Protocolo experimental para análise de expressão gênica.....	47
<b>Figura 6:</b> Efeito do tratamento com fluoxetina sobre o número de falhas e o número de cruzamentos em animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido.....	48
<b>Figura 7:</b> Efeito do tratamento agudo ou repetido com fluoxetina sobre o peso corporal de animais submetidos ao desamparo aprendido.....	49
<b>Figura 8:</b> Variação do peso corporal dos animais durante 7 dias.....	50
<b>Figura 9:</b> Comparação da média do peso corporal dos animais de acordo com o estresse.....	51
<b>Figura 10:</b> Efeito do estresse sobre o número de falhas e cruzamentos de animais tratados com salina e submetidos ao desamparo aprendido.....	52
<b>Figura 11:</b> Efeito do estresse sobre o peso corporal dos animais resilientes ou suscetíveis.....	53
<b>Figura 12:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	54
<b>Figura 13:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	55
<b>Figura 14:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	56
<b>Figura 15:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$ no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	57
<b>Figura 16:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo dorsal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	58
<b>Figura 17:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo dorsal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	59
<b>Figura 18:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo dorsal resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	60
<b>Figura 19:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$ no hipocampo dorsal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	61

<b>Figura 20:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo ventral de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	62
<b>Figura 21:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo ventral de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	63
<b>Figura 22:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo ventral resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	64
<b>Figura 23:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$ no hipocampo ventral de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.....	66
<b>Figura 24:</b> Efeito do tratamento repetido com fluoxetina (10mg/kg) sobre o número de falhas e cruzamentos em animais submetidos ao desamparo aprendido.	67
<b>Figura 25:</b> Efeito do tratamento repetido com fluoxetina sobre o peso corporal dos animais responsivos ou não responsivos.....	68
<b>Figura 26:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	69
<b>Figura 27:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	70
<b>Figura 28:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	71
<b>Figura 29:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$ no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	72
<b>Figura 30:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	73
<b>Figura 31:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	74
<b>Figura 32:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	75
<b>Figura 33:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$ no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	76
<b>Figura 34:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	77
<b>Figura 35:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	78
<b>Figura 36:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	79
<b>Figura 37:</b> Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$ no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.....	80
<b>Figura 38:</b> Esquema de administração combinada de fluoxetina e drogas de interesse.....	90

<b>Figura 39:</b> Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou BBG 25, 50 ou 100mg sobre o número de falhas.....	92
<b>Figura 40:</b> Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou BBG 25, 50 ou 100mg sobre peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido.....	93
<b>Figura 41:</b> Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou MCC950 10mg, MCC950 20mg ou MCC950 30mg.....	94
<b>Figura 42:</b> Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou MCC950 10mg, MCC950 20mg ou MCC950 30mg sobre peso corporal.....	95
<b>Figura 43:</b> Efeito do tratamento combinado de fluoxetina e BGG ou fluoxetina e MCC950 cetamina sobre o número de falhas, cruzamentos, esquivas, fugas e latência total.....	97
<b>Figura 44:</b> Esquema de administração intervalado da cetamina.....	106
<b>Figura 45:</b> Esquema de administração combinada de fluoxetina e cetamina.....	106
<b>Figura 46:</b> Efeito do estresse ou do tratamento repetido com cetamina 15mg ou 30mg sobre o número de falhas, de cruzamentos, de fugas e esquivas dos animais submetidos ao desamparo aprendido.....	108
<b>Figura 47:</b> Efeito do tratamento repetido com cetamina nas doses de 15mg ou 30mg sobre peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido.....	109
<b>Figura 48:</b> Efeito do tratamento combinado de fluoxetina cetamina sobre o número de falhas, cruzamentos, esquivas, fugas e latência total.....	110

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	
1.1. Depressão Maior.....	14
1.1.1. Epidemiologia e Impacto socioeconômico.....	14
1.1.2. Diagnóstico e Tratamento.....	15
1.1.3. Etiologia dos Transtornos Depressivos.....	17
1.1.4. Hipóteses Neurobiológicas para Depressão.....	21
I. Hipótese Monoaminérgica.....	22
II. Hipótese Glutamatérgica.....	23
III. Hipótese Neurotrófica.....	25
IV. Hipótese Neuroimune (Neuroinflamatória).....	27
1.2. Sinalização purinérgica e receptores P2X7 no estresse e na depressão.....	31
1.2.1. Receptores P2X7 e Inflamassoma NLRP3.....	33
<b>2. Objetivos</b> .....	38
<b>3. Estudo 1</b> .....	39
3.1. Objetivos.....	39
3.2. Material e Métodos.....	39
3.3. Procedimentos.....	40
3.4. Delineamento Experimental.....	44
3.5. Análise Estatística.....	47
3.6. Resultados.....	47
3.7. Discussão – Estudo 1.....	80
<b>4. Estudo 2</b> .....	89
4.1. Objetivos.....	89
4.2. Material e Métodos.....	89
4.3. Procedimentos.....	90
4.4. Análise Estatística.....	91
4.5. Resultados.....	91
4.6. Discussão – Estudo 2.....	98
<b>5. Estudo 3</b> .....	104
5.1. Objetivos.....	104
5.2. Material e Métodos.....	104
5.3. Procedimentos.....	104
5.4. Análise Estatística.....	107
5.5. Resultados.....	107
5.6. Discussão – Estudo 2.....	111
<b>6. Discussão Final e Conclusões</b> .....	115
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	119

## **1. Introdução**

### **1.1. Depressão Maior**

#### **1.1.1. Epidemiologia e Impacto socioeconômico**

A depressão maior é um transtorno mental debilitante, de origem multifatorial e alta prevalência (OTTE, 2016). No último levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou-se que cerca de 6% de toda a população mundial sofra de transtorno depressivo maior, considerando uma prevalência de 12 meses da doença (WHITEFORD et al., 2013). No entanto, quando considerada a prevalência por toda a vida, estima-se que cerca de 20% das pessoas irão preencher os critérios diagnósticos para depressão maior em algum momento de suas vidas (VOS et al., 2015). Embora a prevalência mundial estimada seja alta, as prevalências individuais de cada país são bastante variáveis quando consideradas a localização geográfica e o desenvolvimento econômico do país. Países desenvolvidos apresentam índices similares de prevalência entre si (5,5%), e países em desenvolvimento e subdesenvolvidos também (5,9%) (JAMES et al., 2018; OTTE, 2016) e, embora na estimativa geral pareça não haver grandes diferenças, estas podem ser notadas com maior clareza quando comparamos o Brasil (estado de São Paulo), com cerca de 10% da população sofrendo com depressão maior e o Japão, com cerca de 2% ou, ainda a Alemanha, com aproximadamente 3% (BROMET et al., 2011; KESSLER; BROMET, 2013). Esses dados apontam para um recorte cultural e econômico da ocorrência e prevalência dos transtornos depressivos (KESSLER; BROMET, 2013), que também são influenciadas pelo gênero, sendo as mulheres duas vezes mais suscetíveis a desenvolver o transtorno do que os homens (SEEDAT et al., 2009).

Embora possa ocorrer na infância, adolescência e velhice, a maior parte da população afetada é a população adulta, entre 25 e 54 anos e, portanto, a mais ativa economicamente (VOS et al., 2015), o que tem como consequência um impacto econômico significativo quando considerados os custos

com tratamento e as perdas econômicas devido à incapacidade causada pelo distúrbio (TRAUTMANN; REHM; WITTCHEN, 2016). De fato, a OMS classifica o transtorno depressivo maior como uma das principais causa de incapacidade em todo o mundo e um dos principais contribuintes para a carga global de doenças (informação publicada em Janeiro de 2020 e acessada e Abril de 2021 em <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>). Estes dados e estimativas nos permitem concluir que a depressão é um problema de saúde pública que requer atenção em seu diagnóstico e tratamento.

### 1.1.2. Diagnóstico e Tratamento

Os critérios para diagnóstico do transtorno depressivo maior, de acordo com a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (em inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM-5) estão descritos na tabela 1 e envolvem alterações nítidas no afeto e no humor, e em funções cognitivas e neurodegenerativas (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA, 2013). Por ser um transtorno que envolve a percepção e relato do próprio paciente e/ou de terceiros, o diagnóstico pode ser um desafio em si.

	<i>Sintomas</i>	<i>Frequência</i>
<i>Sintomas Fundamentais</i>	1. Humor deprimido (caracterizado por sentimento de tristeza, vazio e/ou desesperança). Em crianças e adolescentes pode ser relatado como humor irritável e agressividade. Esses sintomas podem ser reportados pelo próprio paciente ou por outras pessoas.	Na maior parte do dia, quase todos os dias.
	2. Acentuada diminuição no interesse ou prazer em todas ou quase todas atividades, especialmente as antes consideradas prazerosas. Relato pode ser do próprio paciente ou reportado por outras pessoas.	Na maior parte do dia, quase todos os dias.
<i>Sintomas Acessórios</i>	3. Alterações significativas no peso (ganho ou perda) sem estar fazendo dieta	Quase todos os dias
	4. Redução ou aumento de apetite	Quase todos os dias

5. Hipersonia ou Insônia	Quase todos os dias
6. Agitação ou retardo psicomotor observável por outras pessoas e não meramente sensações subjetivas de estar mais agitação ou mais lento	Quase todos os dias
7. Fadiga ou perda de energia	Quase todos os dias
8. Sentimentos de desvalia ou culpa excessiva ou inapropriada	Quase todos os dias
9. Concentração e raciocínio prejudicados (reportados pelo paciente ou por outras pessoas)	Quase todos os dias
10. Ideação suicida e pensamentos de morte (sem necessariamente um plano), planejamento e tentativa de suicídio	Recorrente

**Tabela 1: Critérios Diagnósticos para Transtorno Depressivo Maior, de acordo com DSM-5**

A maior parte dos tratamentos farmacológicos disponíveis apresentam mecanismos de ação semelhantes, atuando no sistema monoaminérgico, seja inibindo a recaptção ou a degradação de serotonina, noradrenalina e dopamina (LOPEZ-MUNOZ; ALAMO, 2009; PEREIRA; HIROAKI-SATO, 2018). Além de apresentarem diversos efeitos colaterais como agitação, ansiedade, tonturas, boca seca, dores de cabeça, disfunções sexuais, sedação, ganho de peso, dentre outros, estes medicamentos também apresentam uma latência de 4 a 6 semanas para o início do efeito terapêutico, o que leva a uma baixa aderência dos pacientes ao tratamento (DODD et al., 2018). A administração de cetamina – fármaco que atua primariamente sobre o sistema glutamatérgico - por via intravenosa ou intranasal (em *spray*) constitui uma possibilidade de tratamento farmacológico mais recente, sendo indicada para pacientes diagnosticados como resistentes ao tratamento com antidepressivos convencionais (CORREIA-MELO et al., 2020; POPOVA et al., 2019). Apesar de apresentar resultados promissores como a melhora significativa do humor percebida horas após a administração e prolongada por até uma semana, o tratamento com cetamina tem como inconveniente a necessidade de assistência médica durante o procedimento de administração, sendo a intravenosa realizada

apenas por médico anestesista, além da necessidade de o paciente permanecer na clínica ou hospital por um período determinado, para monitoramento de parâmetros como pressão arterial, náuseas e vômitos, perturbações sensoriais e dissociação (TURNER, 2019).

### 1.1.3. Etiologia dos Transtornos Depressivos

A interação entre fatores biológicos (fatores genéticos e epigenéticos) e fatores sociais e de desenvolvimento (exposição a eventos estressores e/ou traumáticos, posição social e poder socioeconômico) é apontada como a principal causa dos transtornos depressivos (LI et al., 2021; SHAO; ZHU, 2020). Contudo, por ser um transtorno multifatorial, a etiologia da depressão ainda não está totalmente clara, apesar de ser um dos transtornos psiquiátricos mais estudados (OTTE, 2016).

Dentre os fatores genéticos, a herdabilidade contribui com 37% de chances de um membro da mesma família desenvolver depressão, sem qualquer evidência de que fatores ambientais contribuem para este agregamento familiar (FLINT; KENDLER, 2014). Esse coeficiente genético também parece estar associado ao sexo: em estudos com gêmeos heterozigotos, a herdabilidade é maior em mulheres do que em homens (40-42% em mulheres *versus* 29-30% em homens) (OTTE, 2016). Nenhum locus foi identificado de maneira robusta a exercer significância em todo o genoma para o desenvolvimento de depressão em estudos de associação do genoma completo (GWAS, do inglês *Genome-wide association study*). Esta falha do GWAS em identificar um locus causativo pode ser atribuída à necessidade de um número amostral muito grande para a detecção de variantes de pequenos efeitos, sendo este um dos obstáculos a serem vencidos na pesquisa sobre a genética da depressão (WRAY et al., 2012). De maneira semelhante ao GWAS, os estudos com genes candidatos também carecem de resultados robustos, especialmente pela falta de concordância entre grupos que pesquisam o tema (FABBRI et al., 2018; FLINT; KENDLER, 2014). Em um estudo analisando com 26 genes candidatos, apenas sete apresentaram resultados estatisticamente significativos: *5HTTLPR/SLC6A4* (região polimórfica localizada na região promotora do gene de transportador de serotonina); *APOE* (gene da apolipoproteína E); *DRD4* (gene codificador do receptor dopaminérgico tipo D4); *GNB3* (codifica a subunidade GB3 da

proteína G); *HTR1A* (codifica o receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>); *MTHFR* (gene codificante da enzima MTHFR que regula os níveis de homocisteína sanguínea); *SLC6A3* (gene do transportador de dopamina) (FLINT; KENDLER, 2014). No entanto, como os próprios autores observam, uma falta de evidência não significa a exclusão do efeito de outros genes testados. Resultados negativos em genética geralmente estão ligados a uma falta de poder em detectar um efeito, seja por conta de um número amostral reduzido ou por sensibilidade da técnica utilizada (FLINT; KENDLER, 2014). Nesse sentido, uma meta-análise realizada com mais de 800 mil indivíduos encontrou que 102 variantes independentes foram correlacionadas com sintomas depressivos, além de 269 genes e 15 conjuntos de genes, que podem ser classificados em dois grandes grupos: um conjunto de genes relacionados à regulação da estrutura e atividade sináptica e outro conjunto regulando as respostas comportamentais a estímulos. Adicionalmente, o estudo também mostrou que grande parte dos 269 genes correlacionados com a depressão é altamente expressa nas regiões corticais, especialmente no córtex pré-frontal, estrutura envolvida na neurobiologia da depressão (HOWARD et al., 2019). Os dados apresentados por estes estudos, embora divergentes, apontam para a fertilidade da pesquisa focada em mecanismos genéticos subjacentes à depressão.

Epigenética é um termo que se refere às variações fenotípicas que não são causadas por alterações na sequência do DNA, mas por mecanismos como metilação do DNA (adição de um radical metil (CH<sub>3</sub>) no carbono 5 da citosina) e modificações pós-translacionais em histonas, resultando na descompactação da cromatina, o que permite a expressão gênica) (SAAVEDRA et al., 2016; VIALOU et al., 2013). Características epigenéticas são potencialmente herdáveis, mas também ambientalmente modificáveis, especialmente durante as fases iniciais do desenvolvimento (JAENISCH; BIRD, 2003). Assim, as alterações epigenéticas podem ser consideradas como uma ponte entre os fatores biológicos e os fatores ambientais. No contexto de transtornos depressivos, o fator ambiental mais relevante é o estresse e, no contexto da epigenética, estresse pode se referir a condições intrauterinas, nutrição e eventos traumáticos após o nascimento (SAAVEDRA et al., 2016). Contrapondo a falha do GWAS em identificar lócus associados aos transtornos depressivos, a

metilação do DNA vem se mostrando uma boa estratégia na identificação de biomarcadores para a depressão. Foram reportadas metilações em genes relacionados a processos característicos da depressão como por exemplo, *BDNF* e *SLC6A4* (FABBRI et al., 2018; SAAVEDRA et al., 2016). A metilação do gene codificante de *BDNF* (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*) está associada à diminuição da produção deste fator neurotrófico e consequente diminuição da proliferação, diferenciação e sobrevivência neural, sendo essa diretamente ligada a um prejuízo cognitivo observado em pacientes diagnosticados com depressão (FERRER et al., 2019; JANUAR et al., 2015). A hipermetilação da região promotora do gene de *BDNF* também foi observada em estudos post-mortem no cérebro (KELLER et al., 2010) e no sangue periférico (KANG et al., 2013a) de indivíduos vítimas de suicídio. O gene *SLC6A*, como já citado, codifica o transportador de serotonina e foi observada a hipermetilação de regiões promotoras deste gene em indivíduos com histórico de traumas sofridos na infância (KANG et al., 2013b) e em pacientes depressivos com reduzido volume hipocampal (BOOIJ et al., 2015). Em um estudo realizado com adultos diagnosticados com depressão, porém sem histórico de traumas infantis, não foi observada nenhuma alteração na metilação do gene *SLC6A* (OKADA et al., 2014), reforçando a hipótese de que as alterações epigenéticas deste gene possam ser um representante de adversidades sofridas na infância e, portanto, um marcador útil de vulnerabilidade para transtornos depressivos (FABBRI et al., 2017).

Os fatores sociais e de desenvolvimento fazem parte dos agentes externos que contribuem para o desenvolvimento da depressão e compreendem a exposição a eventos estressores e/ou traumáticos, a posição social, o poder socioeconômico do indivíduo, e até mesmo o envelhecimento e o puerpério. Estima-se que cerca de 70% dos episódios depressivos seja precedido por um evento estressor, principalmente de origem psicossocial (YANG et al., 2015). A ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) está no centro da hipótese neurobiológica que correlaciona o estresse com o desenvolvimento de transtornos depressivos. Em uma resposta fisiológica normal, um evento aversivo ao ser percebido pelo cérebro, estimula o hipotálamo a secretar o Hormônio Liberador de Corticotrofinas (CRH, do inglês *Corticotropin-Release Hormone*), que irá estimular a glândula pituitária

a secretar o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropin Hormone*) e esse, uma vez circulante na corrente sanguínea, irá estimular as glândulas adrenais, anatomicamente localizadas acima dos rins, a secretarem cortisol. Ao ser transportado para o cérebro, o cortisol irá se ligar aos receptores mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR), sinalizando à hipófise e à pituitária a necessidade de cessar a liberação de CRH e ACTH e, conseqüentemente, a própria adrenal, em um mecanismo de feedback negativo regulatório do eixo HPA (GJERSTAD; LIGHTMAN; SPIGA, 2018; HOLSBOER, 2001). A ativação contínua e prolongada do eixo HPA, conseqüente, por exemplo, de exposições imprevisíveis e incontroláveis a eventos estressores, irá prejudicar esse mecanismo de feedback negativo, fazendo com que haja uma liberação imoderada de cortisol, resultando em níveis sanguíneos aumentados deste hormônio (HOLSBOER, 2001). No cérebro, o hipocampo e o córtex pré-frontal são particularmente afetados pelos níveis aumentados de cortisol, uma vez que o hormônio é capaz de interferir em processos como encolhimento de dendritos, perda de espinhos e destruição de redes neurais nestas estruturas, prejudicando, assim, desde a plasticidade e neurogênese até a sobrevivência de neurônios e células da glia (MCEWEN et al., 2015). Como conseqüência, processos como tomada de decisões, memória espacial, memória de trabalho e comportamentos autorregulatórios do humor e autoavaliação/autopercepção ficam prejudicados, e não coincidentemente, estas são características presentes nos transtornos depressivos (MCEWEN et al., 2015).

Dados clínicos demonstraram que os níveis de ACTH e de cortisol e os batimentos cardíacos de mulheres com histórico de abuso sexual na infância e depressão na vida adulta, eram maiores do que mulheres sem histórico de trauma e sem transtornos psiquiátricos (grupo controle) quando expostas a situações de estresse psicossocial (discurso público ou resolução de problemas matemáticos perante público) (HEIM et al., 2008). De maneira interessante, mulheres que sofreram abuso na infância e não desenvolveram depressão na vida adulta, apresentaram ativação normal do eixo HPA durante a exposição aos estressores, sugerindo uma adaptação da adrenal à sensibilização central como um mecanismo de resiliência contra o estresse precoce (HEIM et al., 2008). Estudos realizados com

animais corroboram a influência do estresse psicossocial sobre alterações estruturais no cérebro e alterações no sistema neuroendócrino: camundongos submetidos ao protocolo de separação materna no período de 05-21 dias pós-natal (período correspondente à infância em humanos) apresentaram aumento na expressão gênica do receptor CRH e diminuição da expressão gênica de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> localizados no hipocampo. Estes animais também apresentaram maior consumo de etanol e preferência pelo lado escuro da caixa no modelo de claro-escuro (comportamento associado a ansiedade), quando comparados com os animais que não passaram pela separação materna (DE ALMEIDA MAGALHÃES et al., 2018).

Organismos biológicos estão sujeitos a eventos estressores que podem, inclusive serem catalisadores de adaptações fisiológicas e evoluções biológicas (BADYAEV, 2005). Essa relação se complica quando a intensidade do estresse e o tempo de exposição ao estressor ocorrem de maneira tal que impossibilita a adaptação do indivíduo, resultando em desequilíbrio neuroquímico, danos estruturais no encéfalo, prejuízos em processos importantes para a vida cotidiana como memória, aprendizado e autoconsciência, e no desenvolvimento de transtornos psicológicos e doenças sistêmicas crônicas (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Entender os mecanismos envolvidos na etiologia dos transtornos depressivos nos permite buscar novas alternativas de tratamento e desmistificar o estigma que os distúrbios mentais ainda carregam socialmente.

#### **1.1.4. Hipóteses Neurobiológicas para Depressão**

Ao longo dos anos, diversas hipóteses foram propostas para explicar as diferenças biológicas entre o cérebro de um indivíduo diagnosticado com depressão e o cérebro de um indivíduo considerado saudável. O desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas como neuroimagem, análise gênica e análise proteica, permitiu um maior entendimento dos sistemas neurais e das moléculas envolvidas nos transtornos depressivos, levando ao surgimento de diversas hipóteses para a neurobiologia da depressão. Por se tratar de um transtorno multifatorial, as hipóteses propostas

para explicar a neurobiologia da depressão devem ser vistas de maneira complementar e nunca excludentes.

**I. Hipótese Monoaminérgica:** a primeira a ser proposta, entre as décadas de 50 e 60, após observações clínicas de que pacientes diagnosticados com tuberculose e tratados com iproniazida apresentavam uma melhora prolongada do humor (SELIKOFF; ROBITZEK, 1952). Ao investigarem o mecanismo de ação, descobriram que o medicamento é um inibidor da enzima monoaminaoxidase (MAO), responsável pela degradação de monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) (ZELLER; BARKSKY, 1952). Simultaneamente, a imipramina era testada como agente anti-histamínico e, de maneira semelhante à iproniazida, causava melhoras no humor dos pacientes (KUHN, 1958). A imipramina foi o primeiro antidepressivo tricíclico desenvolvido e seu mecanismo de ação consiste em inibir a recaptação das monoaminas (AXELROD; WHITBY; HERTTING, 1961; CARLSSON; FUXE; UNGERSTEDT, 1968). Com base nesses conhecimentos iniciais, a hipótese monoaminérgica clássica propunha que a depressão é resultado de uma hipofunção das vias monoaminérgicas, sendo o tratamento com antidepressivos capaz de restabelecer a neurotransmissão dessas vias (LAPIN; OXENKRUG, 1969; SCHILDKRAUT, 1965). A grande maioria dos fármacos antidepressivos disponíveis atualmente foi desenvolvida de acordo com essa hipótese, na tentativa de modular um ou mais sistemas monoaminérgicos (LOPEZ-MUNOZ; ALAMO, 2009). Apesar de amplamente aceita e estudada, a hipótese monoaminérgica não é suficiente para explicar por exemplo, a latência observada de 04 a 06 semanas para início do efeito terapêutico, sendo que os níveis plasmáticos de antidepressivos já estão aumentados no sangue dos pacientes desde a primeira semana de tratamento (OSWALD; BREZINOVA; DUNLEAVY, 1972). Uma das explicações para essa latência é a de que o tratamento agudo com antidepressivos é capaz de ativar os receptores serotoninérgicos somatodendríticos de função inibitória, 5-HT<sub>1A</sub>, localizados nos núcleos da rafe. Como consequência irá ocorrer uma diminuição do disparo dos neurônios serotoninérgicos e subsequente diminuição da liberação de serotonina, especialmente em regiões límbicas (BLIER; EL MANSARI, 2013). O tratamento crônico com antidepressivos leva à dessensibilização desses receptores, permitindo que

neurotransmissão serotoninérgica seja restabelecida e o efeito terapêutico seja percebido pelo paciente (BLIER; ABBOTT; UNIT, 2001). Além disso, a hipótese monoaminérgica também falha em responder por que 45-60% dos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento farmacológico com antidepressivos convencionais (PENN; TRACY, 2012).

No sistema nervoso dos mamíferos, os corpos celulares dos neurônios monoaminérgicos que enviam projeções prosencefálicas estão presentes nos núcleos da rafe, para os neurônios serotoninérgicos; no *locus coeruleus* para os neurônios noradrenérgicos; e na *substantia nigra* e área tegmental ventral, para os neurônios dopaminérgicos. A partir destes centros, saem projeções para estruturas do sistema límbico (amígdala, hipocampo, giro do cíngulo, núcleos mamilares, habênula e tálamo) e para o córtex pré-frontal, importantes na modulação de processos emocionais, motivação e enfrentamento ao estresse (CHANDLER; LAMPERSKI; WATERHOUSE, 2013). Corroborando a hipótese monoaminérgica, indivíduos diagnosticados com depressão apresentam uma diminuição nos níveis plasmáticos e plaquetários de monoaminas (DELGADO, 2000). No entanto, estudos *post mortem* com vítimas de suicídio não apresentaram diferenças nos metabólitos de monoaminas quando comparados com grupo controle (pacientes falecidos por outras causas diferentes de suicídio) (BESKOW et al., 1976; ROY; JONG; LINNOILA, 1989). Adicionalmente, a depleção de triptofano, aminoácido precursor de serotonina, não é capaz de induzir sintomas característicos da depressão em indivíduos saudáveis (MERENS et al., 2008; RUHÉ; MASON; SCHENE, 2007), evidenciando a participação de outros sistemas na neurobiologia da depressão.

**II. Hipótese Glutamatérgica:** Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e exerce seus efeitos através de receptores metabotrópicos e ionotrópicos, especialmente os receptores NMDA (N-metil D-Aspartato) e AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) (WILLARD; KOOCHKPOUR, 2013). A hipótese glutamatérgica para depressão foi elaborada no início dos anos 90, após estudos mostrando que antagonistas do receptor NMDA eram capazes de induzir efeito tipo-antidepressivo em animais expostos aos teste de suspensão pela causa e ao teste de nado

forçado (TRULLAS; SKOLNICK, 1990) e propõe que eventos estressores são capazes de perturbar a neurotransmissão glutamatérgica, fazendo com que a liberação de glutamato seja prolongada ao mesmo tempo que sua metabolização seja atrasada, levando à uma situação de excitotoxicidade sináptica. Ao longo dos anos a hipótese foi sendo aprimorada, com evidências de que a excitotoxicidade é capaz de levar a prejuízos como neuroinflamação, diminuição de fatores neurotróficos - que são essenciais para sobrevivência neuronal -, diminuição da neurogênese e neuroplasticidade prejudicada (SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012).

A maior contribuição da hipótese glutamatérgica foi a possibilidade de uso clínico da cetamina. Desenvolvida em 1965 como anestésico dissociativo (DOMINO; CHODOFF; CORSSSEN, 1965), a cetamina somente teve seu mecanismo de ação elucidado mais de uma década depois, em paralelo com estudos de caracterização do sistema glutamatérgico e a identificação do receptor NMDA, que é seu principal alvo de ação (ANIS et al., 1983). Porém, foi somente no início dos anos 2000 que o primeiro trabalho mostrando o efeito antidepressivo rápido e sustentando da cetamina foi publicado: pacientes deprimidos foram tratados intravenosamente com dose subanestésica (0,5mg/kg) de cetamina e relataram melhora nos sintomas após 72h da administração (BERMAN et al., 2000).

Até o presente momento, sabe-se que a ação antidepressiva da cetamina se dá através do bloqueio dos receptores NMDA que tem efeito os seguintes processos subsequentes: 1. A inibição da ação modulatória de GABA sobre os neurônios glutamatérgicos, causando um aumento na liberação de glutamato (WECKMANN et al., 2019), que contribui para o processo seguinte, 2. a ativação dos receptores AMPA, que tem como consequência a ativação de uma complexa cascata intracelular envolvendo a ativação de mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) e levando ao aumento da liberação de BDNF (JOURDI et al., 2009). Todos esses eventos participam de processos já conhecidos por serem essenciais à ação de antidepressivos monoaminérgicos, como a neuroplasticidade e neurogênese, corroborando o efeito antidepressivo da cetamina (MAENG; ZARATE, 2007). Outro composto atuante no sistema glutamatérgico que foi estudado como um

substituto para a cetamina é o Glyx-13 (ou Rapastinel), modulador do sítio de glicina dos receptores NMDA (BURCH et al., 2016). A glicina atua como um agonista no receptor NMDA, facilitando a ativação desse pelo glutamato. Assim, o rapastinel ao se ligar no sítio da glicina, é capaz de reduzir a ação do glutamato sobre os receptores NMDA (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013). Estudos pré-clínicos demonstraram que o tratamento agudo com rapastinel foi capaz de induzir efeito antidepressivo em camundongos submetidos ao teste de nado forçado, com o envolvimento da sinalização AMPA-mTOR, semelhante ao da cetamina (BURGDORF et al., 2015), com a vantagem de não apresentar efeitos psicomiméticos da mesma (MOSKAL et al., 2016 ). Os estudos clínicos realizados com pacientes deprimidos e tratados com rapastinel mostraram efeitos promissores nas fases I e II, porém falharam na fase III, tendo o estudo sendo encerrado pela empresa detentora da patente do composto (estudo disponível em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03668600?intr=rapastinel&phase=2&draw=2&rank=1> – última atualização em julho de 2020 e acessado em Abril de 2021).

**III. Hipótese Neurotrófica:** elaborada entre o final da década de 90 e começo dos anos 2000, essa hipótese propõe que a depressão é resultado da diminuição de fatores neurotróficos e tem como consequências a atrofia neuronal, a diminuição da neurogênese hipocampal e perda de células da glia, sendo o tratamento com antidepressivos eficaz em bloquear ou reverter esses efeitos por promover a produção e liberação dos fatores neurotróficos (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997; DUMAN; MONTEGGIA, 2006). Fatores neurotróficos são uma família de biomoléculas constituída por peptídeos ou pequenas proteínas, que regulam a sobrevivência, o crescimento, a síntese e plasticidade de células neuronais (HEFTI et al., 1993). Como já abordado anteriormente, o fator neurotrófico de maior envolvimento na neurobiologia da depressão é o BDNF, que é diretamente modulado pelo sistema glutamatérgico. Assim, é possível concluir que a hipótese neurotrófica é convergente da hipótese glutamatérgica (DUMAN; LI, 2012).

Diversos estudos mostraram animais expostos a estressores como derrota social (ARENDETT et al., 2012; PIZARRO et al., 2004), estresse de restrição (NAERT et al., 2011) e choques nas patas (RASMUSSEON; SHI; DUMAN, 2002) apresentam níveis gênicos e proteicos diminuídos de BDNF no hipocampo, no córtex e na amígdala. Porém, essa diminuição parece ser diretamente proporcional à duração da exposição, ao tipo de estressor e até mesmo ao sexo do roedor (BATH; SCHILIT; LEE, 2013). Foi observado um aumento nos níveis proteicos de BDNF no hipocampo de ratas fêmeas submetidas a uma sessão aguda de choques nas patas, sendo esse aumento revertido quando a exposição aos choques foi realizada de maneira repetida (LIN et al., 2009). Do mesmo modo, ratos expostos a uma sessão curta de estresse de restrição (60 minutos) apresentaram níveis gênicos aumentados de BDNF no hipocampo. Porém, os pares que foram submetidos a uma sessão cinco vezes mais longa (300 minutos) do mesmo tipo de estresse, apresentaram uma diminuição dos níveis gênicos de BDNF abaixo do controle (MARMIGÈRE et al., 2003). De maneira complementar, diversos estudos demonstraram que os efeitos dos antidepressivos tricíclicos, ISRS e IRSN são dependentes dos níveis de BDNF: camundongos *knockouts* heterozigotos para BDNF (+/-) se mostraram irresponsivos ao tratamento com imipramina ou com fluoxetina no teste do nado forçado (SAARELAINEN et al., 2003); fêmeas de camundongos *knockouts* condicionais para BDNF, com deleção do fator neurotrófico no prosencéfalo, apresentaram comportamento tipo-depressivo após exposição crônica ao estresse, e responsividade atenuada ao tratamento com desipramina quando submetidas ao teste de nado forçado (MONTEGGIA et al., 2007); a deleção de BDNF no giro denteado (sub-região do hipocampo) de camundongos machos atenuou o efeito tipo-antidepressivo da desipramina e do citalopram no teste de nado forçado (ADACHI et al., 2008).

Embora pouco numerosos, alguns estudos *post-mortem* demonstraram uma correlação direta entre depressão e baixos níveis de BDNF, inclusive sendo esses níveis correlatos com os níveis de pacientes com demência, indicando que níveis baixos de BDNF podem ser um fator moderador para o envelhecimento cerebral acelerado (NUNES et al., 2018). Em pacientes com histórico de depressão e tratados com ISRS ou antidepressivo tricíclico foi observado um aumento nos níveis de BDNF no

córtex parietal, evidenciando que em humanos o tratamento com antidepressivos também é capaz de modular a expressão de fatores neurotróficos (SHELDRIK et al., 2017). Um dos mecanismos mais recentes propostos para o efeito de antidepressivos é a ligação destes fármacos ao receptor de BDNF, conhecido como TRKB (do inglês, *tyrosine kinase receptor 2*) (CASAROTTO et al., 2021). Estes receptores são capazes de formarem dímeros com domínios transmembrânicos, onde as moléculas de antidepressivos como fluoxetina, imipramina e cetamina se ligam diretamente, impelindo em um maior tráfego de BDNF. Esse aumento nos níveis do fator neurotrófico promove plasticidade e sobrevivência neuronal, sendo estes processos diretamente ligados ao efeito terapêutico dos antidepressivos (CASAROTTO et al., 2021).

Outros fatores neurotróficos como Fator de Crescimento Nervoso (NGF, do inglês, *nerve growth factor*) e Neurotrofina-3 (NT-3) também se apresentam diminuídos em estruturas cerebrais envolvidas na neurobiologia da depressão como hipocampo e córtex pré-frontal, amígdala e *nucleus accumbens* em animais submetidos a estresses de desamparo aprendido (SCHULTE-HERBRÜGGEN et al., 2006) e separação materna (DELLA et al., 2013), por exemplo. Em pacientes depressivos não tratados, também foi observado uma diminuição de NGF (WIENER et al., 2015), sendo a severidade dos sintomas correlacionada com os níveis desse fator neurotrófico (DE AZEVEDO CARDOSO et al., 2014). O potencial efeito antidepressivo do NGF foi testado em modelos animais e, embora tenha apresentado um efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado, esse efeito foi menos robusto que o da desipramina, desencorajando a pesquisa em humanos (OVERSTREET et al., 2010).

**IV. Hipótese Neuroimune (Neuroinflamatória):** elaborada nos anos 90, a partir da observação da presença de citocinas pró-inflamatórias circulantes no plasma de pacientes diagnosticados com depressão, essa hipótese propõe que o desenvolvimento da depressão é uma resposta do cérebro à ativação da resposta pró-inflamatória, causada por eventos estressores físicos ou psicológicos (MAES et al., 1991). Sob uma perspectiva evolutiva, é possível entender as respostas inflamatórias como resultado das interações humanas com agentes patogênicos, predadores e outros humanos rivais

(MILLER; RAISON, 2016). Estas respostas incluíam um conjunto integrado de respostas imunológicas e comportamentais que conservavam energia para combater infecções e cicatrizar feridas, ao mesmo tempo em que era necessário manter a vigilância contra possíveis ataques. Com a evolução social e cultural, os agentes patogênicos foram substituídos por desafios psicológicos e estímulos estressores, que são capazes de instigar o repertório ancestral de respostas imunológicas e comportamentais levando ao desenvolvimento de distúrbios imunes e psiquiátricos como a depressão (MILLER; RAISON, 2016).

Estudos com humanos demonstraram que administração de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- $\alpha$ , comum em tratamento contra câncer ou hepatite-C é capaz de induzir diminuição nos níveis de triptofano e sintomas depressivos como alterações cognitivas e anedonia nos pacientes (BONACCORSO et al., 2002), sendo esses revertidos pela administração de antidepressivos (CAPURON et al., 2002). De maneira complementar, indivíduos diagnosticados com depressão e não tratados apresentam níveis plasmáticos elevados de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), proteína C-reativa, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês, *tumor necrosis factor*), sendo os níveis dessas citocinas menores após tratamento crônico (6-8 semanas) com ISRS ou antidepressivos tricíclicos (KIM et al., 2007; LANQUILLON et al., 2000). Também foi demonstrado um aumento nos receptores TLR (do inglês, *Toll-like receptors*, responsáveis pela detecção e reconhecimento de moléculas e patógenos, iniciando a resposta imune) localizados no córtex pré-frontal (PANDEY et al., 2019), e alterações morfológicas de micróglia no hipocampo, córtex pré-frontal dorsolateral e no córtex cingulado anterior (STEINER et al., 2008) de pacientes depressivos vítimas de suicídio. Ainda, indivíduos com doenças autoimunes como artrite reumatoide frequentemente apresentam sintomas depressivos (KOJIMA et al., 2009), sendo esses sintomas revertidos pelo tratamento com fármacos anti-inflamatórios (KÖHLER et al., 2014).

Em modelos animais, a exposição a estressores também tem influência direta sobre o sistema imune. Ratos expostos ao estresse de restrição apresentaram aumento de TNF- $\alpha$  no córtex pré-

frontal, 1h após o início do estresse. De maneira interessante, o tratamento com antagonista NMDA foi capaz de prevenir esse aumento, evidenciando a interação dos sistemas imune e glutamatérgico em mecanismos de enfrentamento ao estresse (MADRIGAL et al., 2002). Em outro estudo, a exposição de ratos a uma única sessão de choques inescapáveis foi capaz de aumentar a expressão de IL-1 $\beta$  (RNAm e proteína) no hipocampo, hipotálamo, pituitária e no baço (indicando o efeito sistêmico do estresse). No entanto, o mesmo estressor não foi capaz de alterar a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 em nenhuma das estruturas analisadas, sugerindo que as alterações nos níveis de citocinas são diretamente influenciadas pelo tipo de estressor (O'CONNOR et al., 2003). Adicionalmente, de maneira semelhante ao que observamos em humanos, a administração de agentes capazes de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias também é capaz de induzir sintomas tipo-depressivos, alterações em estruturas e processos cerebrais e até mesmo alterações sistêmicas nos animais. Por exemplo: animais tratados com INF-  $\alpha$  apresentaram neurogênese diminuída no giro denteado e aumento de IL-1 $\beta$  no hipocampo (KANEKO et al., 2006), alterações na temperatura e peso corporal, na ingestão de comida e na atividade locomotora, além de anedonia (DE LA GARZA et al., 2005). A administração de LPS, uma endotoxina bacteriana, é um modelo animal bastante utilizado para induzir uma condição chamada de "sickness behavior", caracterizada por letargia, redução da exploração e da interação social, perda de apetite, sensibilidade à dor e anedonia (PRATHER, 2013), além de aumento da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  na circulação sistêmica, córtex, hipocampo e plexo coroide (GIBB et al., 2008; KONSAMAN et al., 2008), sendo uma das principais ferramentas para o estudo dos mecanismos inflamatórios envolvidos em distúrbios psiquiátricos.

## **1.2. Sinalização purinérgica e receptores P2X7 no estresse e na depressão**

O sistema purinérgico compreende a ação dos nucleotídeos de purina (ATP – adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; e adenosina) como mensageiros extracelulares, que ocorre através da ativação dos receptores ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y, e de receptores metabotrópicos P1 (ou receptores de adenosina) (BURNSTOCK, 1980). O ATP é produzido por

fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, podendo ser liberado no espaço extracelular após estímulos fisiológicos ou patológicos através de exocitose vesicular, transporte por canais transmembrânicos (canais de panexina, conexinas e hemicanais) ou até mesmo apoptose celular (FUJII, 2004). Uma vez no espaço extracelular, o ATP pode interagir com os receptores P2Y (metabotrópicos) ou com receptores P2X (ionotrópicos) ou, ainda sofrer rápida metabolização até ser convertido em adenosina que, por sua vez, pode agir nos receptores P1 (metabotrópicos) ou ser recaptada para sofrer conversão a ATP novamente, ou, ainda, sofrer metabolização até ser convertida em ácido úrico (BURNSTOCK, 1980). A tabela 2 resume os subtipos de receptores purinérgicos e seus respectivos ligantes.

Receptor	Subtipo	Classe	Ativação
P1	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>	Metabotrópico	Adenosina
P2Y	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14	Metabotrópico	Nucleotídeos (ATP, ADP, UTP, UDP-glicose)
P2X	P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7	Ionotrópico	ATP

**Tabela 2: Receptores purinérgicos.** ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; UDP: uridina difosfato; UTP: uridina trifosfato

Dentre os receptores purinérgicos, o subtipo P2X7 é o mais peculiar e o mais estudado no contexto de transtornos psiquiátricos. Com uma cauda N-terminal curta, 2 domínios transmembrânicos ligados por uma alça extracelular e uma cauda C-terminal longa, composta por 239 aminoácidos (em contraste com os 27-129 aminoácidos que formam a cauda C-terminal dos outros receptores P2X), os receptores P2X7 requerem uma concentração de ATP cerca de 100 vezes maior do que a dos outros receptores P2X para a sua ativação, sendo, portanto, ativados em situações em que altos níveis de ATP (VOLONTE et al., 2012). Adicionalmente, a ativação prolongada e persistente

de P2X7 leva à formação de um poro dilatado, permeável a moléculas hidrofílicas de até 900KDa, transformando o receptor em um canal de transporte para moléculas de grande peso molecular (SURPRENANT et al., 1996; SURPRENANT; ALAN NORTH, 2009).

Estudos com humanos indicaram a ocorrência de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), nomeado rs2230912, no gene codificante de P2X7 em pessoas diagnosticadas com depressão (LUCAE et al., 2006). Essa alteração tem como consequência a substituição de aminoácidos glutamina para arginina na posição 460 (Gln460Arg) na cauda C-terminal dos receptores P2X7, afetando o influxo de  $Ca^{+2}$ , a dimerização de P2X7 e as interações com outras proteínas que participam da sinalização purinérgica mediada pelos receptores P2X7 (LUCAE et al., 2006). Em um estudo de caso-controle, no entanto, não foram encontradas diferenças na presença do SNP rs2230912 entre pacientes com depressão e pacientes saudáveis, embora tenha sido reportado que a severidade dos sintomas estava diretamente relacionada à presença do polimorfismo (HEJJAS et al., 2009).

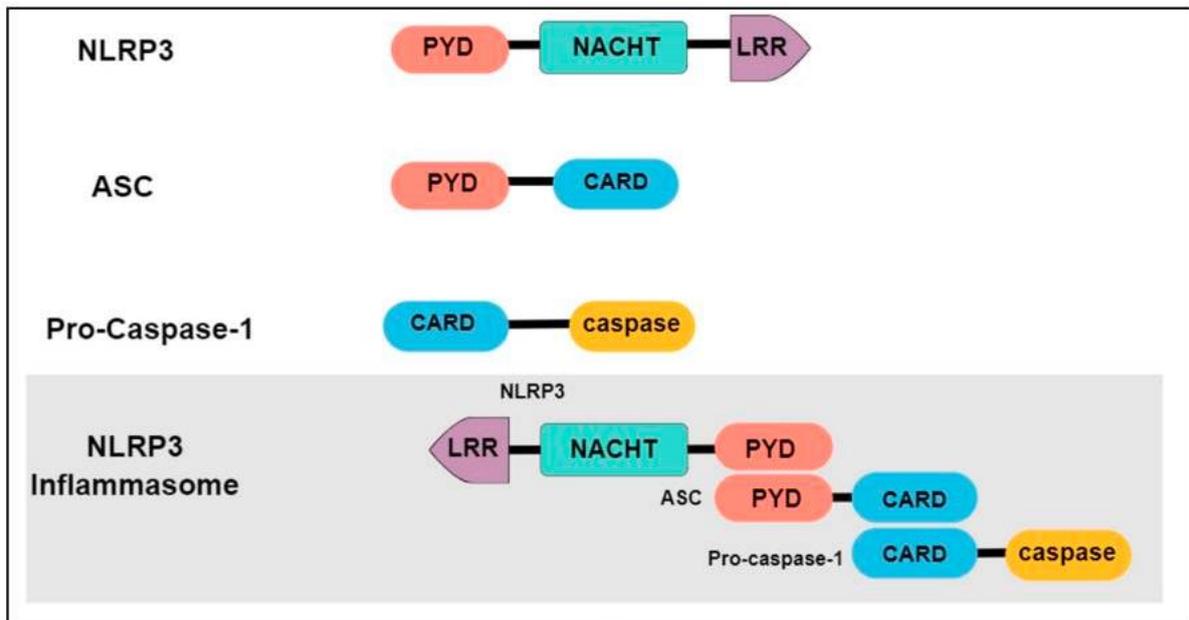
A pesquisa com humanos é inerentemente difícil e, portanto, os dados são limitados, sendo os estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* bastante úteis para o entendimento da participação dos receptores P2X7 nos mecanismos de resposta ao estresse e na depressão. Nesse sentido, estudos demonstraram que camundongos humanizados para P2X7, portando a variante alterada (hP2X7R-Gln460Arg), demonstraram vulnerabilidade quando expostos ao modelo de derrota social, embora não apresentasse alterações na atividade de P2X7, quando comparados com os animais portadores da variante normal (hP2X7R-selvagens). Adicionalmente, os animais que expressavam as variantes em heterozigose apresentavam distúrbios de sono e prejuízos nas funções de P2X7, o que também foi observado em indivíduos humanos saudáveis, indicando que a heterozigose dos receptores P2X7 pode constituir um fator de vulnerabilidade ao indivíduo, através da interação genética com a exposição ao estresse (METZGER et al., 2017). Ainda no contexto genético, foi demonstrado que animais *knockout* (KO) para receptores P2X7 apresentaram comportamento tipo-antidepressivo no teste do nado forçado e no teste de suspensão pela cauda, dois modelos animais preditivos para ação de

antidepressivos. Esses animais, quando tratados com dose sub-efetiva de imipramina apresentaram uma redução mais acentuada da imobilidade no teste do nado forçado, indicando que a ausência ou inibição da sinalização mediada por receptores P2X7 pode contribuir para ação dos antidepressivos (BASSO et al., 2009). Em outro estudo foi observado que os animais P2X7 KO submetidos ao teste de nado forçado apresentaram comportamento tipo-antidepressivo apenas quando expostos de maneira repetida ao estresse, e que, segundo os autores, a ausência de receptores P2X7 e consequentemente um prejuízo nas vias mediadas pelo receptor podem constituir um mecanismo de adaptação ao estresse agudo, conferindo resiliência ao animal (BOUCHER et al., 2011)

Altamente expressos no sistema nervoso central, os receptores P2X7 foram inicialmente reportados em micróglia, astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann (YU et al., 2008)). Em neurônios, a expressão destes receptores já foi bastante debatida e controversa (ILLES; KHAN; RUBINI, 2017) mas, através da técnica de hibridização *in situ*, juntamente com o desenvolvimento de anticorpos mais sensíveis e seletivos, foi possível observar a expressão de P2X7 em neurônios (YU et al, 2008). Considerando a expressão em praticamente todos os tipos celulares presentes no sistema nervoso central, os receptores P2X7 são propostos por exercer papel central na chamada sinapse tripartite, uma sinapse composta por dois neurônios e um astrócito (ILLES et al. 2011). Neste tipo de sinapse, os neurônios são capazes de ativar astrócitos que, por sua vez, irão modular a atividade dos neurônios. Na sinalização purinérgica, esse processo ocorre com os neurônios liberando ATP e este se ligando a receptores purinérgicos localizados em astrócitos, de maneira que isso estimule a liberação mais ATP, além de outros neurotransmissores como glutamato, que irão atuar no próprio neurônio e em outros neurônios subjacentes. O estímulo dos receptores P2X7 localizados nos astrócitos e no terminal nervoso neuronal, aumenta a concentração de  $Ca^{+2}$  intracelular, que é um gatilho para a liberação de vesículas contendo neurotransmissores; adicionalmente, o estímulo dos receptores P2X7 também leva a um influxo de  $K^{+}$ , um dos gatilhos propostos para a ativação de complexos intracelulares chamados de inflamassoma (ILLES et al, 2011; FERNADEZ et al, 2015)

### 1.2.1. Receptores P2X7 e Inflamassoma NLRP3

Desde que foi observado o aumento de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos deprimidos (MAES et al., 1991), a participação do sistema imune na depressão vem sendo amplamente investigada. Frente a um estímulo e/ou ameaça, o sistema imune pode apresentar dois tipos de respostas, adaptativa ou inata, sendo esta última a responsável pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) e de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern*) (NEWTON; DIXIT, 2012). O reconhecimento dessas moléculas é feito através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), expressos em células do sistema imune como macrófagos, micróglia, células dendríticas, monócitos e neutrófilos (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Dentre os diferentes tipos de PRRs, o mais recentemente descrito é o inflamassoma, um complexo proteico de alto peso molecular, presente no citosol das células imunes (BROZ; DIXIT, 2016). O inflamassoma mais estudado e bem caracterizado é o NLRP3 (do inglês, *NLR family pyrin domain containing 3*), pertencente à família de receptores do tipo NOD e são constituídos por três partes: um domínio C-terminal composto por repetições ricas em leucinas (LRR); um domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NATCH), centralmente localizado que regula a auto-oligomerização; um domínio de pirina N-terminal (PYD) que recruta a proteína adaptadora ASC, responsável pela ligação à pró-caspase 1 (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2007; SCHRODER; TSCHOPP, 2010)(FERNANDES-ALNEMRI et al., 2007; SCHRODER; TSCHOPP, 2010) (figura 1).

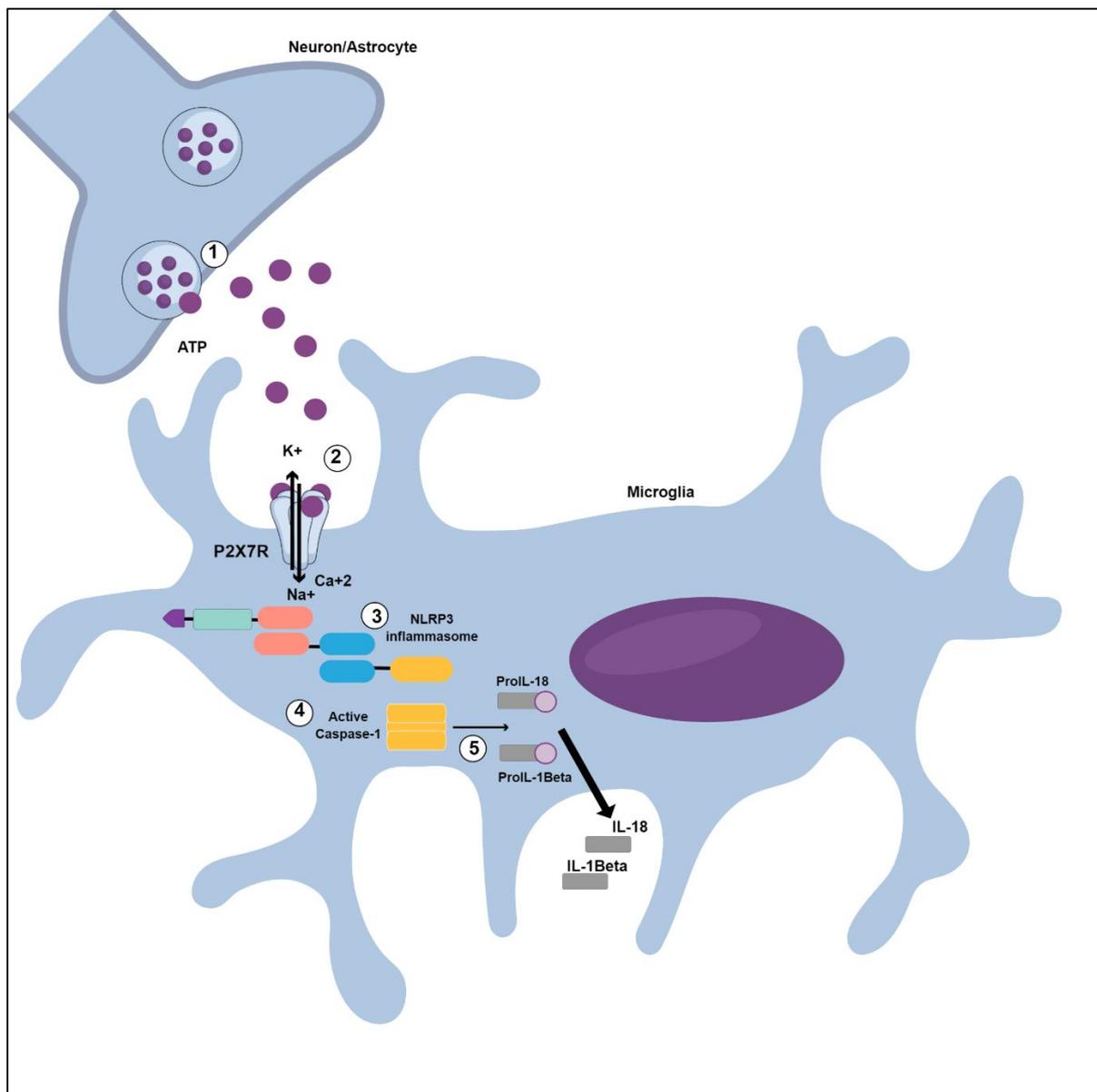


**Figura 1: Representação dos componentes do inflamassoma NLRP3.** ASC: proteína adaptadora (*apoptosis-associated speck-like protein*); CARD: domínio recrutador da caspase (*caspase recruitment domain*); LRR: domínio de repetições ricas em leucinas (*leucine-rich repeats*); NACHT: domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos; PYD: domínio efetor pirina (*PYRIN domain*) (Retirado de Ribeiro et al, 2019)

A liberação de PAMPs e DAMPs é o gatilho para ativação e montagem do inflamassoma NLRP3, que se abre e permite a interação entre o domínio PYD localizado no monômero NLRP3 e o domínio PYD localizado na proteína adaptadora ASC. Em seguida, o domínio CARD localizado na proteína ASC se liga ao domínio CARD localizado na pró-caspase-1, originando o inflamassoma NLRP3. A formação desse complexo induz a autoclivagem da pró-caspase-1, gerando a caspase-1, responsável pela clivagem de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas respectivas formas ativas IL-1 $\beta$  e IL-18, que serão secretadas das células imunes ativadas (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2007).

A exposição a eventos estressores (psicológicos ou físicos) é capaz de causar um aumento na liberação de ATP, o que pode ser interpretado como um DAMP pelo sistema imune no SNC, ativando os receptores P2X7, altamente expressos em micróglias. Essa ativação permite o influxo de Ca<sup>+2</sup> e Na<sup>+</sup>, bem como o efluxo de K<sup>+</sup>, sendo a diminuição deste último íon no microambiente citosólico um gatilho para a ativação do inflamassoma NLRP3 que culmina na liberação das citocinas pró-inflamatórias

(CISNEROS-MEJORADO et al., 2014), como representado na figura 2. Corroborando essa proposta, foi demonstrado que cultura celular de micróglia quando estimuladas por altas concentrações de ATP aumentavam a expressão de NLRP3, proteína ASC e de caspase-1, com consequente aumento na liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, o que não ocorreu em cultura celular de astrócitos, indicando que a expressão de NLRP3 pode ser específico de micróglia (GUSTIN et al., 2015). Adicionalmente, a prevenção do efluxo de K<sup>+</sup> da micróglia foi capaz de bloquear a ativação do inflamassoma NLRP3, indicando que baixas concentrações deste íon no microambiente intracelular é o que permite a ativação do complexo proteico (GUSTIN et al., 2015). Em animais também já foi demonstrada a interação de P2X7-inflamassoma NLRP3: camundongos P2X7-KO expostos ao modelo de desafio imune com LPS apresentaram comportamento tipo-antidepressivo nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado, além de níveis aumentados de BDNF e 5-HT no hipocampo (BASSO et al., 2009). Em outro estudo, camundongos expostos ao modelo de estresse crônico apresentaram níveis elevados de ATP, caspase-1, proteína ASC e IL-1 $\beta$  no hipocampo, além de comportamento tipo-depressivo, sendo o tratamento com BBG ou A438079, antagonistas P2X7, capaz de prevenir a ativação da cascata do inflamassoma NLRP3 (YUE et al., 2017). Também foi demonstrado que o tratamento crônico com BBG ou fluoxetina reverteu as alterações comportamentais e a ativação microglial do córtex e hipocampo de animais expostos a estresse crônico (FAROOQ et al., 2018), enquanto que o tratamento agudo com A-804598 foi capaz de bloquear a ativação de inflamassoma NLRP3 e a liberação de IL-1 $\beta$  no hipocampo de animais submetidos ao estresse de restrição (IWATA et al., 2016)



**Figura 2: Ativação do inflamassoma NLRP3 mediada por receptores P2X7.** 1: ATP liberado de neurônios e/ou astrócitos ativam os receptores P2X7 localizados nas micróglia; 2: Ativação de P2X7 tem como consequência o efluxo de K<sup>+</sup>, gatilho para a oligomerização e montagem do inflamassoma; 3: Inflamassoma NLRP3 é um mediador da ativação de caspase-1; 5: caspase-1 cliva as formas precursoras de IL-1 $\beta$  e IL-18, sendo as formas ativas liberadas no espaço extracelular. Adaptado de Ribeiro et al, 2019.

Baseado em nos dados apresentados, é possível concluir que os mecanismos de interação e modulação entre os sistemas purinérgico e imune carecem de elucidação, especialmente frente a um estímulo estressor e no que diz respeito à expressão de seus componentes nas estruturas envolvidas na fisiopatologia da depressão. Dessa maneira, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar

a hipótese de que o tratamento com antagonista purinérgico seria capaz de prevenir o desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos e que essa prevenção envolveria o controle da ativação da cascata NLRP3/caspase-1/IL-1 $\beta$ . De maneira complementar, hipotetizamos também que o tratamento com o inibidor da cascata de inflamassoma NLRP3 seria capaz de prevenir os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse e que este efeito teria o envolvimento de componentes do sistema purinérgico.

## 2. Objetivos

**2.1. Objetivo Geral:** Avaliar a participação de P2X7 e NLRP3 na mediação das consequências comportamentais do estresse e na resposta a antidepressivos.

### 2.2. Objetivos Específicos:

- i. Analisar os efeitos do estresse do tratamento com fluoxetina sobre o comportamento de animais submetidos ao desamparo aprendido, bem como a expressão de gênica de NLRP3, Caspase1, IL-1 $\beta$ , P2X7R, no hipocampo e córtex pré-frontal destes mesmos animais;
- ii. Investigar se o tratamento repetido (7 dias) com BBG (antagonista P2X7R) ou MCC950 (inibidor de inflamassoma) seria capaz de prevenir o déficit comportamental induzido pelo estresse inescapável e imprevisível no modelo de desamparo aprendido;
- iii. Examinar se o tratamento repetido (7 dias) com MCC950 (inibidor de inflamassoma) seria capaz de prevenir o déficit comportamental induzido pelo estresse inescapável e imprevisível do modelo de desamparo aprendido;
- iv. Analisar se a administração repetida de cetamina (antagonista de receptores NMDA) seria capaz de prevenir o déficit comportamental induzido pelo estresse inescapável e imprevisível do modelo de desamparo aprendido;
- v. Investigar se a associação da fluoxetina com cetamina, ou BBG ou MCC950 seria capaz de prevenir o déficit comportamental induzido pelo estresse inescapável e imprevisível do modelo de desamparo aprendido.

### **3. Estudo 1: Efeito do tratamento com fluoxetina em animais da linhagem Wistar Hannover submetidos ao modelo de desamparo aprendido:**

**3.1. Objetivos:** O presente estudo objetivou avaliar o efeito do tratamento com fluoxetina sobre o comportamento e sobre os níveis de RNAm do receptor P2X7, e dos componentes da cascata inflamatória NLRP3, caspase-1 e IL-1 $\beta$ , em animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido. Adicionalmente,

### **3.2. Material e Métodos**

#### **3.2.1. Animais**

Foram utilizados ratos machos da linhagem Hannover com idade aproximada entre 7 e 8 semanas (250 – 350g), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (4 animais/gaiola nas medidas de 41 × 34 × 16 cm) no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, em condições controladas: temperatura (24 $\pm$ 10C), ciclo de luz (acesas das 7:00 às 18:00 horas), com livre acesso a alimento e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados respeitando as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo o projeto submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovado sob o número de protocolo 18.1.371.60.1

#### **3.2.2 Drogas**

Para a caracterização da resposta farmacológica ao antidepressivo convencional, utilizamos o Cloridrato de Fluoxetina (Prati-Donaduzzi, #713198), um inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina, diluído em salina isotônica estéril + 10% de tween80, administrado na dose de 10 mg/kg/mL/dia (FERNÁNDEZ MACEDO et al., 2013). A escolha deste fármaco foi baseada no fato de pertencer à classe de fármacos de primeira escolha no tratamento clínico de transtornos depressivos

(PETERSEN et al., 2002). A droga foi preparada sempre imediatamente antes do uso e administrada intraperitonealmente.

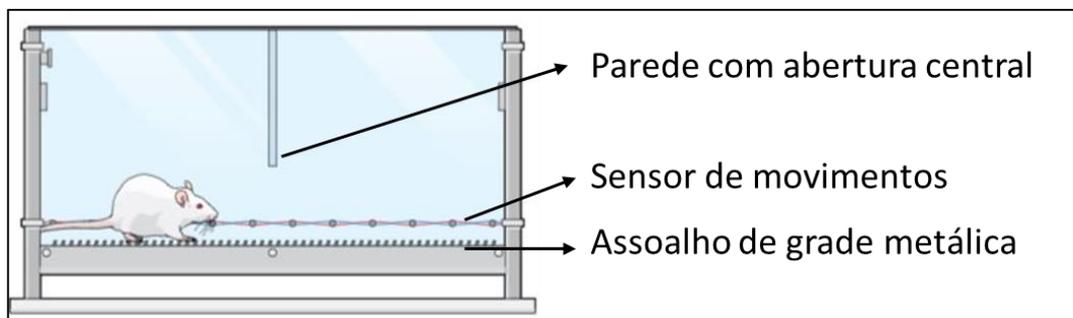
### **3.3. Procedimentos**

#### **3.3.1. Teste de Desamparo Aprendido**

Para a realização do LH foi utilizada a caixa de Esquiva Ativa para Ratos (Insight medidas: 37 x 33 x 54 cm) separada ao meio por uma parede com abertura central, por onde é possível que o animal cruze de um compartimento para o outro, assoalho de grade metálica, através do qual os animais receberam os choques nas patas, e um sensor de movimento por toda face traseira interna, como demonstrado na figura 3. O protocolo comportamental utilizado foi padronizado em nosso laboratório (STANQUINI et al., 2017) e consistiu em uma sessão pré-teste (PT) em que os animais foram colocados na caixa por 40 minutos, recebendo choques inescapáveis de 0,8 mA com 10 s de duração e intervalo randomizado de 30–90 segundos; e em uma sessão teste (T), em que foram aplicados 30 choques de 0,6 mA com duração e intervalo iguais à sessão PT. Na sessão T, porém, os choques eram escapáveis e precedidos por um tom de aviso (60 dB, 670 Hz, 5 seg antes do choque). A quantidade de fugas, esquivas e falhas bem como o número de cruzamento durante os intervalos foram gravadas pelo software Esquiva Ativa – Insight Equipamentos, que também controlava a liberação dos choques, os intervalos e sons durante as sessões.

Os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com o estresse aplicado: animais estressados e animais não estressados. O grupo estressado passou pela sessão PT e T, enquanto o grupo não estressado foi apenas habituado na caixa de esquiva durante a sessão PT, sendo a sessão T conduzida normalmente. Imediatamente após a sessão PT todos os animais foram mantidos isolados, com livre acesso à comida e água até o momento da sessão T. Os experimentos foram repetidos em dias diferentes, com todos os grupos de tratamento igualmente distribuídos durante os dias, até que se completasse o número de animais necessário para a análise. Além disso, por se tratar de um

experimento longo (de 6 a 8 horas de duração, aproximadamente), os grupos de tratamento foram randomizados ao longo do dia para evitar possíveis influências circadianas.



**Figura 3:** Representação ilustrativa de uma caixa de esquiva, utilizada para induzir o desamparo aprendido nos animais.

### 3.3.2. Dissecção e preparo das amostras

Imediatamente após o teste comportamental, os animais foram decapitados, e seus encéfalos removidos para a coleta de estruturas envolvidas na neurobiologia da depressão, a saber: CPF, HPC dorsal e HPC ventral. As amostras foram coletadas em micro tubos de 2mL livres de RNase-/DNase (Axygen #MCT-200-C-S), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de preparo para as técnicas moleculares.

### 3.3.3. Isolamento e leitura de RNA

Para a extração de RNA foram adicionados  $500\ \mu\text{L}$  de trizol (TRI Reagent®; Sigma-Aldrich, #93289) em cada amostra, com incubação de 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados  $200\ \mu\text{L}$  de clorofórmio em cada amostra e estas agitadas em vórtex por 15 segundos e novamente deixadas em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $12\ 000\ \text{g}$  e a fase aquosa coletada. Foram acrescidos  $0,5\text{mL}$  de propranolol em cada amostra, e estas misturadas e incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $12.000\text{g}$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Logo após o sobrenadante ser removido, o pellet de RNA foi lavado com  $1\ \text{mL}$  de etanol 75% e centrifugado a  $7.000\text{g}$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este último processo (etanol mais centrifugação) foi repetido duas vezes

e, em seguida, adicionado 1 mL de etanol 100% seguido de centrifugação a 12 000g por 5 min a 4°C. Ao final, o etanol foi removido e os pellet foram deixados em temperatura ambiente durante 15 minutos para evaporação dos reagentes. Para diluição do pellet, foram adicionados 20 µL de água miliQ passando a solução algumas vezes pela ponteira.

As amostras de RNA isolados seguiram para leitura no NanoDrop (ThermoFisher Scientific), sendo as concentrações de RNA em nanogramas/µL e a razão 260/280 (razão de ácido nucleico por proteínas totais) medidas para cada amostra. O método utilizado foi o de absorbância, no qual também é possível detectar a presença de contaminantes. Foi adotado como critério uma razão 260/280 maior que 1.7, como recomendado pelo fabricante do TRI Reagente. A leitura foi realizada com 1 µL de cada amostra. Após a leitura, as amostras foram novamente armazenadas a -80°C até a realização do procedimento seguinte.

#### **3.3.4. Tratamento com DNase**

Com o objetivo de garantir a pureza do RNA extraído, as amostras passaram pelo tratamento com DNase, utilizando o kit Ambion DNase I (RNase-free) (ThermoFisher #AM2222). Após o cálculo de µL necessários para obtenção de 2 µg de RNA de cada amostra, foram adicionados 0,64 µL de buffer; 1 µL de enzima DNase; água livre de nucleasse até completar; 2 µg RNA (amostra). Os tubos foram colocados no termociclador durante 30 minutos a 37°C e, em seguida, foram adicionados 1,60 µL de EDTA em cada amostra, totalizando um volume final de 8 µL para cada amostra. As amostras foram retornadas ao termociclador por 10 minutos a 75°C e em seguida armazenadas a -80°C até a síntese de cDNA.

#### **3.3.5. Síntese de cDNA**

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit para a reação de transcriptase reversa da Applied biosystems (#4374966). Em cada microtubo de 200µL (autoclavados e livre de RNA), foram adicionados 2 µL de RT Buffer 10X; 0,8 µL de 25x dNTP Mix (100mM); 2 µL 10X RT Random Primers; 1 µL MultiScribe Reverse Transcriptase; 1 µL RNase inhibitor; água livre de nucleasse até

completar 20 µL; 2 µg RNA (amostra). Os tubos foram rapidamente centrifugados por 15 segundos e colocados no termociclador por 10 minutos a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C para que se completasse a reação. Ao final, foram adicionados 180 µL em cada microtubo e as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da realização do PCR.

### 3.3.6. PCR em tempo real

Em uma placa de 96 poços (Applied Biosystems # N8010560) foram adicionados, em cada poço, 1,8 µL água livre de nuclease, 0,6 µL da sequência *forward* do primer de interesse (10 µM), 0,6 µL da sequência *reward* do primer de interesse (10 µM), 5 µL do reagente PowerUp SYBR Green Master Mix 2X e 2 µL da amostra a ser analisada. A placa foi selada com adesivo óptico, colocada no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific #4376600) e submetida aos seguintes passos: 1. Preparo (10 min a 95°C); 2. Desnaturação (15 s a 95°C); 3. Anelamento e Extensão (1 min a 60°C) - Os passos 2 e 3 foram repetidos 40 vezes em ciclo – 4. *Melting1* (15s a 95°C); 5. *Melting2* (1 min a 60°C); 6. *Melting3* (15s a 95°C). Os primers utilizados foram:

<b>P2X7</b>	FWD: 5'- GGGAGGTGGTTCAGTGGGTAA -3' / REV: 5'- GGATGCTGTGATCCCAACAAA -3'
<b>NLRP3</b>	FWD: 5'-GTGGAGATCCTAGGTTTCTCTG-3' / REV: 5'-CAGGATCTCATTCTCTTGATC-3'
<b>Caspase1</b>	FWD: 5'-GAGCTGATGTTGACCTCAGAG-3' / REV: 5'-CTGTCAGAAGTCTTGTGCTCTG-3'
<b>IL-1β</b>	FWD: 5'-TGCTGTCTGACCCATGTGAG-3' / REV: 5'-GTCGTTGCTTGTCTCTCCTTG-3'
<b>GAPDH</b>	FWD: 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3' / REV: 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'
<b>HPRT1</b>	FWD: 5'-GCAGACTTTGCTTTCCTTGG-3' / REV: 5'-CGAGAGGTCCCTTTCACCAG-3'
<b>Rpl13a</b>	FWD: 5'-CGCCTCAAGGTGTTGGATGG-3' / REV 3'-CTGCTACTGCCTGGTACTTCC-5'
<b>Tnrc6a</b>	FWD: 5'-TACTGTGCGGGAAGTTGACC-3' / REV 3'-TTGTGCTGTACTGCTGAGGG-5'

**Tabela 3:** sequência dos primers utilizados para quantificação gênica

O parâmetro analisado foi o Delta-Delta Ct, através do método de Vandesompele, medida que avalia de maneira quantitativa a diferença de expressão entre os genes de interesse (componentes do inflamassoma e receptores purinérgicos) e múltiplos genes de referência (HPRT1, GAPDH, Rpl13a, Tnrc6A) (VANDESOMPELE et al., 2002). Foi realizada curva de eficiência para todos os

primers utilizados no presente trabalho e todos os primers apresentaram eficiência igual ou superior a 98%.

### 3.4. Delineamento Experimental

#### 3.4.1. Experimento 1: Caracterização da resposta farmacológica ao tratamento com fluoxetina em animais da linhagem Wistar Hanover submetidos ao modelo de desamparo aprendido

O objetivo deste experimento foi a caracterização farmacológica da linhagem Wistar Hanover, recém disponibilizada no campus quando no início deste projeto. A fluoxetina foi o fármaco escolhido como controle positivo do delineamento experimental e, dessa maneira, foi necessário padronizar e atestar se a dose escolhida (10mg/kg) seria capaz de reverter os déficits comportamentais induzidos pelo estresse do desamparo aprendido. Em relação ao estresse, os animais foram divididos em não estressados (habituaados) e estressados. O tratamento farmacológico durou 7 dias, sendo iniciado no dia 1, imediatamente após a saída do animal da sessão PT e encerrado no dia 7, 1h antes do animal ir para a sessão T. As administrações foram realizadas de acordo com o tratamento a ser recebido:

-**Veículo (VEIC)**: injeções intraperitoneais de salina uma vez ao dia, por 7 dias;

-**Fluoxetina Aguda (FLX AGD)**: injeções intraperitoneais de salina uma vez ao dia, do dia 1 ao dia 6. No sétimo dia, 1h antes da sessão T, os animais foram tratados com FLX;

-**Fluoxetina Repetida (FLX RPT)**: injeções intraperitoneais de FLX uma vez ao dia, por 7 dias.

As sessões PT e T, assim como o tratamento farmacológico foram realizados conforme a figura 4:



**Figura 4:** Protocolo experimental para avaliar o efeito do tratamento agudo e repetido com fluoxetina em animais submetidos ao desamparo aprendido. ⚡ : 40 choques inescapáveis na intensidade de 0,8mA, duração de 10s e 60±30s de intervalo entre os choques. ⚡ : 30 choques escapáveis na intensidade de 0,6mA, 🔊 duração de 10s e precedidos por um som (60dB, 670Hz).

Neste protocolo, cada animal é capaz de apresentar as seguintes consequências comportamentais durante a sessão T:

*-Fuga:* ao ouvir o som e receber o choque, o animal cruza a caixa e interrompendo ambos os estímulos de som e choque;

*-Esquiva:* o animal cruza a caixa ao ouvir o som, evitando o choque;

*-Falha:* o animal permanece sempre do mesmo lado da caixa, falhando em fugir ou esquivar dos estímulos estressores.

Como a sessão teste é composta por 30 ciclos, a soma dos comportamentos de fuga, esquiva ou falha de cada animal é sempre 30.

### **3.4.2.: Classificação dos animais de acordo com a resposta ao estresse e ao tratamento com antidepressivo**

Ao final do experimento de caracterização da resposta farmacológica ao tratamento com fluoxetina, observamos uma pronunciada heterogeneidade nas respostas comportamentais dos animais, tanto em relação ao estresse quanto em relação ao tratamento farmacológico. Assim, com o objetivo de compreender melhor esse fenômeno, classificamos os animais entre resilientes ou suscetíveis em relação ao estresse, e responsivos ou não responsivos em relação ao tratamento farmacológico. Os critérios adotados para a classificação foram o tratamento recebido (veículo ou fluoxetina) e o número de falhas, uma vez que este é o comportamento que caracteriza o desamparo aprendido (RICHTER et al., 2014). A tabela 4 ilustra a classificação dos animais e separação dos grupos. Para os animais estressados e tratados com veículo, consideramos resilientes ao estresse os animais que apresentaram número de falhas menor ou igual a 10, e suscetíveis ao estresse os animais com número de falhas maior ou igual a 15. Para o grupo controle destes animais, atribuímos os animais não estressados e tratados com veículo. Para os animais estressados e tratados com fluoxetina, consideramos responsivos ao tratamento os animais que apresentaram número de falhas menor ou

igual a 10, e não responsivos ao tratamento os animais com número de falhas maior ou igual a 15. O grupo controle desta divisão foram os animais não estressados e tratados com fluoxetina. Embora no delineamento original houvessem os grupos não estressado e estressado tratados com fluoxetina aguda, estes grupos foram excluídos da nova classificação pois foram realizados apenas a título de demonstração farmacológica, uma vez que o desamparo aprendido é um modelo que responde apenas ao tratamento repetido ou crônico com antidepressivos convencionais, similarmente ao observado na clínica (SHERMAN; SACQUITNE; PETTY, 1982).

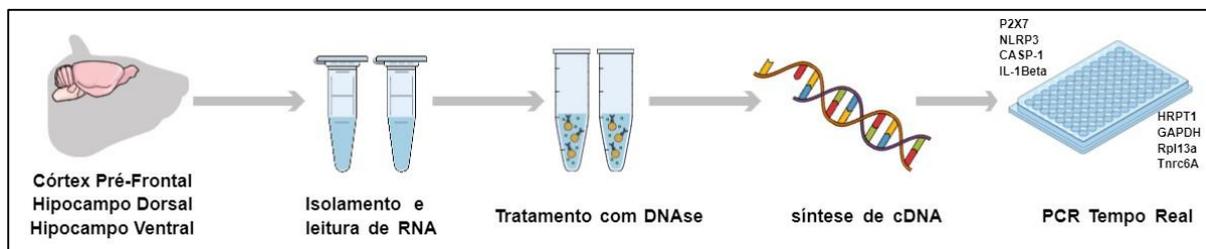
Estresse e Tratamento Farmacológico	Número de Falhas	Classificação
Estressados – Veículo	Menor que 10	<b>Resilientes</b> ao estresse
Estressados – Veículo	Maior que 15	<b>Suscetíveis</b> ao estresse
<i>Não Estressados</i> - Veículo	indiferente	Controle dos RES X SUSCT
Estressados – FLX	Menor que 10	<b>Responsivos</b> ao tratamento
Estressados – FLX	Maior que 15	<b>Não Responsivos</b> ao tratamento
<i>Não Estressados</i> - FLX	indiferente	Controle dos RESP X NRESP

**Tabela 4: Critérios de classificação dos animais de acordo com o grupo de tratamento, estresse e número de falhas.** FLX: fluoxetina; RES: resilientes; SUSCT: suscetíveis; RESP: responsivos; NRESP: não responsivos.

### 3.4.3. *Experimento 2: Análise da expressão gênica para P2X7R, NLRP3, caspase-1 e IL-1 $\beta$ no córtex, hipocampo dorsal e hipocampo ventral de animais resilientes ou susceptíveis / responsivos ou não responsivos*

Após a separação dos animais de acordo com a responsividade ao estresse ou ao tratamento farmacológico, seguiu-se a mesma classificação para as análises moleculares com o objetivo de estabelecer uma possível correlação entre comportamento e expressão gênica. Para normalização dos genes alvos, foram utilizados os seguintes genes de referência: HRPT1, GAPDH, Rpl13a e Tnrc6a. A expressão de cada gene alvo foi normalizada por cada gene de referência separadamente e também

pela média geométrica dos valores dos quatro genes de referência. Os procedimentos experimentais foram realizados como descritos anteriormente e esquematizados a seguir:



**Figura 5:** Protocolo experimental para análise de expressão gênica de receptores P2X7 e dos componentes da cascata de inflamassoma NLRP3/casp-1/IL-1 $\beta$  no CPF, HPCd e HPCv de animais resilientes ou suscetíveis e responsivos e não-responsivos

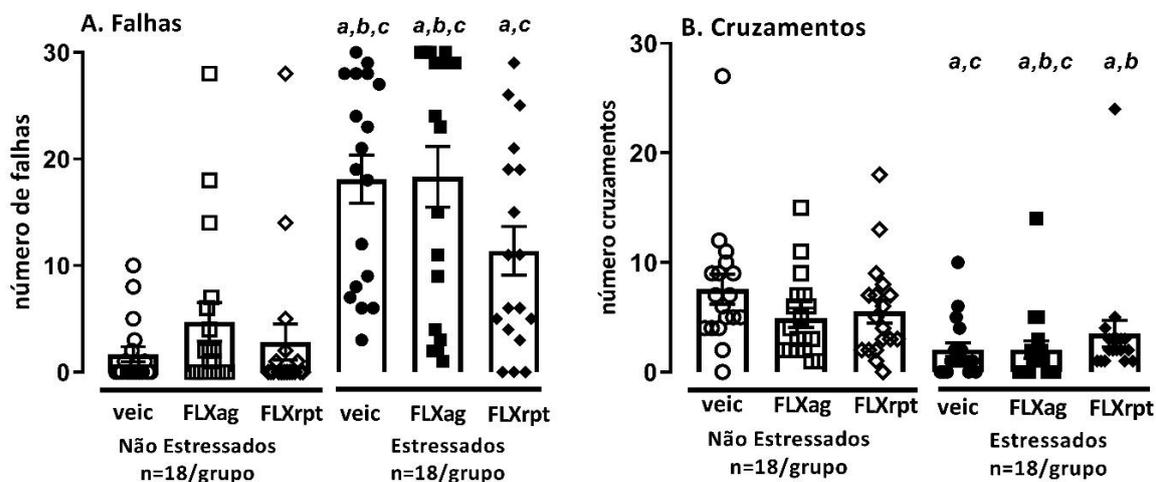
### 3.5. Análise Estatística

Para os dados comportamentais do desamparo, antes e após a classificação dos animais, foram analisados o número de falhas e o número de cruzamentos através do método de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. A análise de peso corporal foi realizada através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas, sendo considerados os fatores dias de tratamento (1 a 7) e grupo de tratamento. Quando houve diferença significativa em um dos fatores, os grupos foram analisados separadamente de acordo com os dias de tratamento ou o estresse, através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tuckey. Os dados de expressão gênica também foram analisados através do método Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, uma vez que a análise através de estatística paramétrica apresentava variância significativa entre os grupos, indicada pelo teste de Bartlett.

## Resultados

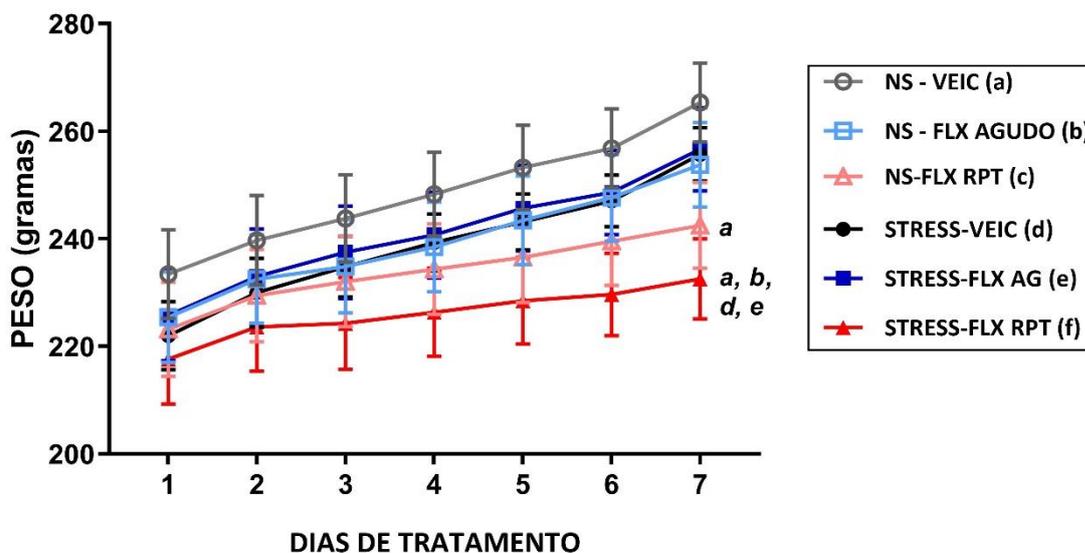
### 3.6.1. Efeito do tratamento com fluoxetina sobre o comportamento e peso corporal de animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido

O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn mostrou haver diferenças significativas tanto no número de falhas ( $H=51,81$ ;  $p<0,0001$ , figura 6A) quanto no número de cruzamentos ( $H=33,67$ ;  $p<0,0001$ , figura 6B) entre os animais não estressados e estressados.



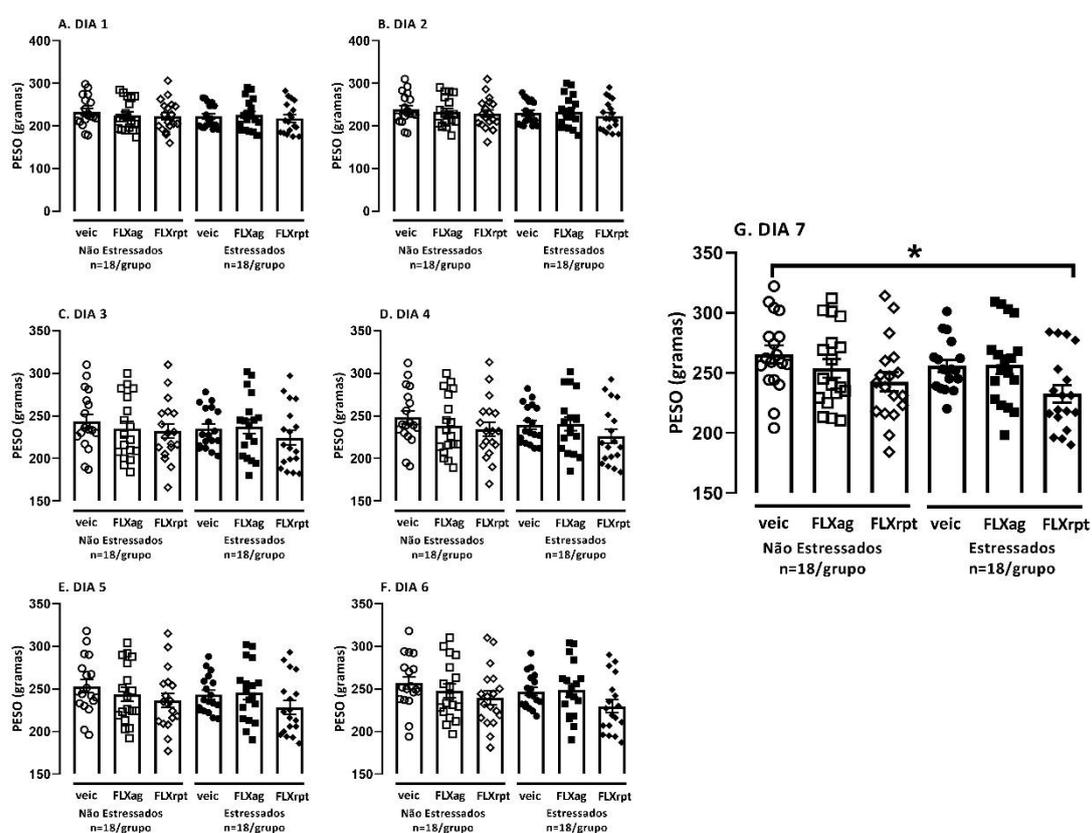
**Figura 6: Efeito do tratamento com fluoxetina sobre o número de falhas (A) e o número de cruzamentos (B) em animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido.** Os animais foram expostos à sessão PT (sem receber os choques no caso dos grupos não estressados) e tratados com salina ou fluoxetina (10mg/kg/dia) durante 7 dias. Uma hora após a última injeção, os animais foram submetidos à sessão T e os dados comportamentais coletados. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 animais por grupo. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. As letras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre a=Não Estressados Veiculo; b= Não Estressados Fluoxetina aguda; c= Não Estressados Fluoxetina repetida.

Em relação ao peso corporal dos animais, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou interação entre os fatores dias de tratamento e condição ( $F_{(30, 612)} = 4,792$ ;  $p < 0,0001$ ) e diferença significativa no tempo de tratamento ( $F_{(1,859, 189,6)} = 309,4$ ;  $p < 0,0001$ ) mas não na condição ( $F_{(5, 102)} = 0,9614$ ). O teste post-hoc de Tuckey indicou que os animais do grupo Não estressado Fluoxetina Repetido apresentaram menor peso quando comparados com os animais do grupo Não Estressado Veículo (a;  $p = 0,0111$ ). De maneira semelhante, os animais do grupo Estressado Fluoxetina Repetido apresentaram menor peso corporal em relação aos animais dos grupos Não Estressado Veículo (a;  $p < 0,0001$ ), Não Estressado FLX agudo (b;  $p = 0,0280$ ), Estressado Veículo (d;  $p = 0,0099$ ) e Estressado FLX agudo (e;  $p = 0,0082$ ).



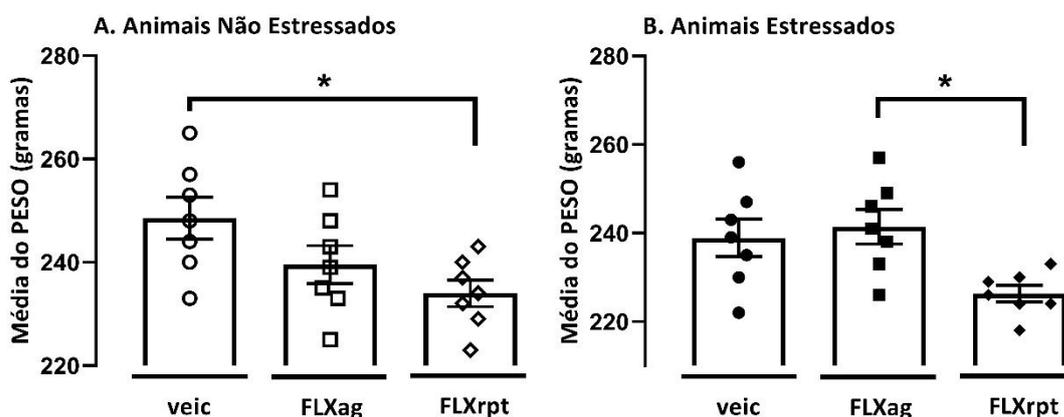
**Figura 7: Efeito do tratamento agudo ou repetido com fluoxetina sobre o peso corporal de animais submetidos ao desamparo aprendido.** O peso corporal de cada animal foi mensurado imediatamente após a sessão PT e todos os dias subsequentes antes de cada administração intraperitoneal. A última medida foi realizada no dia 7, uma hora antes da sessão T. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18$  animais por grupo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Tuckey. As letras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre a=Não Estressados Veículo; b= Não Estressados Fluoxetina aguda; c= Não Estressados Fluoxetina repetida; d=Estressados Veículo; e= Estressados Fluoxetina aguda; f= Estressados Fluoxetina repetida

A análise dos 7 dias separadamente através da ANOVA de uma via seguida do teste de Tuckey, demonstrou que, no sétimo dia, os animais do grupo Estressado Fluoxetina Repetida apresentam peso corporal menor do que os animais do grupo Não Estressados Veículos ( $F_{(5, 102)} = 2,557$ ;  $p=0,0319$ ; figura 8G). Não houve diferença significativa entre os grupos no dia 1 ( $F_{(5, 102)} = 0,4160$ ; figura 8A), dia 2 ( $F_{(5, 102)} = 0,4226$ ; figura 8B), dia 3 ( $F_{(5, 102)} = 0,6333$ ; figura 8C), dia 4 ( $F_{(5, 102)} = 0,8826$ ; figura 8D), dia 5 ( $F_{(5, 102)} = 1,206$ ; figura 8E), ou dia 6 ( $F_{(5, 102)} = 1,566$ ; figura 8F)



**Figura 8: Variação do peso corporal dos animais durante 7 dias.** O peso corporal de cada animal foi mensurado imediatamente após a sessão PT e todos os dias subsequentes antes de cada administração intraperitoneal. A última medida foi realizada no dia 7, uma hora antes da sessão T. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18$  animais por grupo. ANOVA de uma via seguida do teste de Tuckey O asterisco indica diferença significativa entre o grupo Não Estressado Veículo e o grupo Estressado Fluoxetina Repetida ( $p=0,0319$ ).

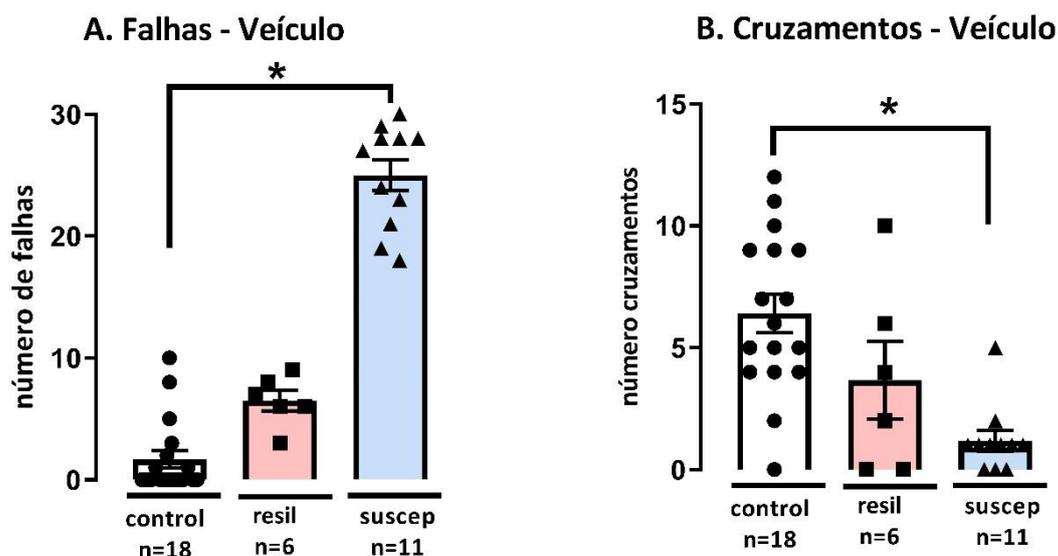
A análise da média corporal através da ANOVA de uma via seguida do teste de Tuckey, demonstrou que, os animais do grupo Não Estressado, os que foram tratados com Fluoxetina Repetida apresentam peso corporal menor do que os animais do grupo Veículo ( $F_{(2,18)} = 4,419$ ;  $p = 0,0275$ ; figura 9A), enquanto que no grupo Estressado, os animais tratados com Fluoxetina Repetida apresentam peso corporal menor do que os animais do grupo Fluoxetina Repetida ( $F_{(2,18)} = 5,365$ ;  $p = 0,0149$ ; figura 9B).



**Figura 9: Comparação da média do peso corporal dos animais de acordo com o estresse.** A média foi calculada através da soma de todos os valores individuais de peso corporal e dividida pela quantidade total de valores (peso corporal individual/18 = média de cada dia). Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18$  animais por grupo. ANOVA de uma via seguida do teste de Tuckey. Os asteriscos indicam diferença significativa entre (A) o grupo Não Estressado Veículo e o grupo Não Estressado Fluoxetina Repetida ( $p=0,0275$ ) e (B) Estressados Fluoxetina Aguda e Estressados Fluoxetina Repetida ( $p=0,0149$ )

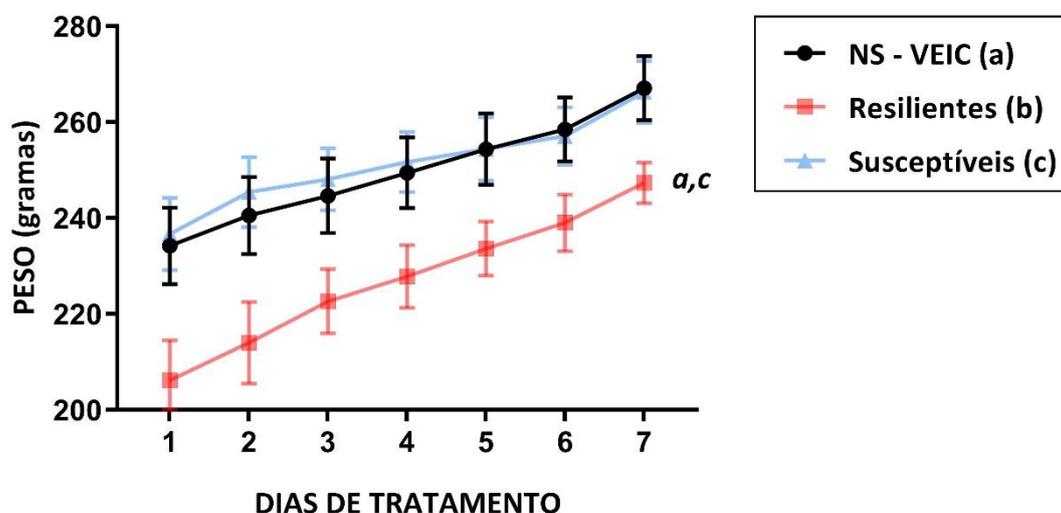
### 3.6.2. Efeito do estresse em animais classificados como resilientes ou suscetíveis.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou diferença significativa no número de falhas ( $H=26,58$ ,  $p<0,0001$ ; figura 10A) e de cruzamentos ( $H=13,67$ ,  $p=0,0007$ ; figura 10B) dos animais classificados como suscetíveis em comparação com o grupo controle



**Figura 10: Efeito do estresse sobre o número de falhas (A) e cruzamentos (B) de animais tratados com salina e submetidos ao desamparo aprendido.** Os animais foram classificados como resilientes quando apresentaram número de falhas menor ou igual a 10 e em suscetíveis quando apresentaram número de falhas maior ou igual a 15. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo controle (não estressado veículo) e o grupo suscetível ( $*p<0,05$ ). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=suscetíveis ao estresse.

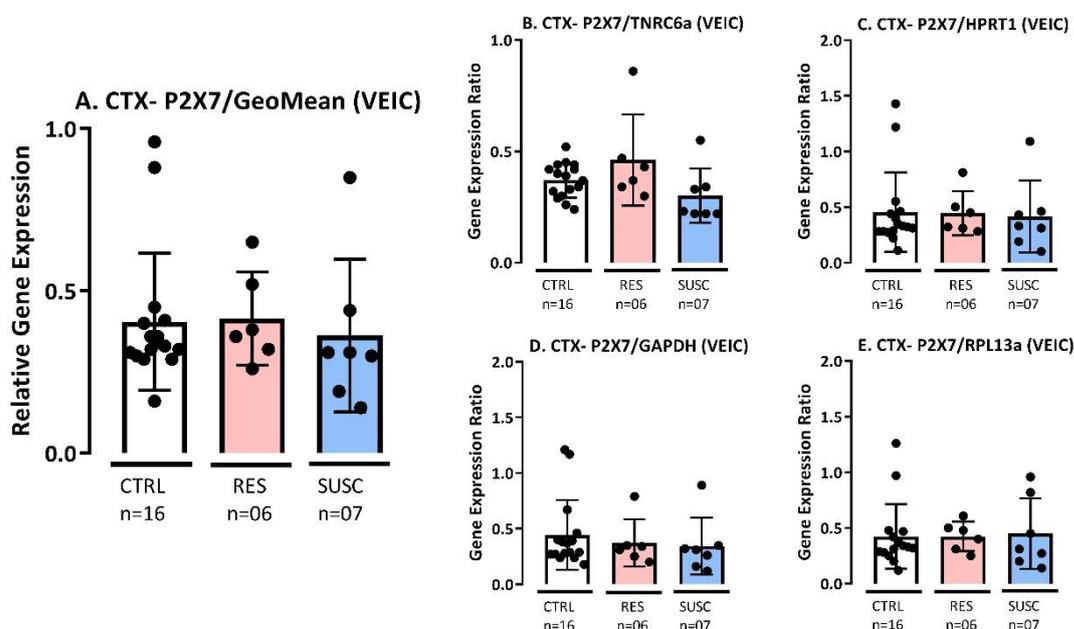
A ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou não haver interação entre os fatores dias de tratamento e condição ( $F_{(12, 192)} = 0,7635$ ;  $p=0,6874$ ). Houve diferença significativa na tempo de tratamento ( $F_{(1,460, 46,72)} = 127,1$   $p<0,0001$ ) mas não na condição ( $F_{(2, 32)} = 2,785$ ). O teste post-hoc de Tuckey indicou que os animais classificados como Resilientes apresentaram menor peso quando comparados com os animais do grupo Susceptível (c;  $p<0,0001$ ) ou do grupo Não Estressado Veículo (a;  $p<0,0001$ ).



**Figura 11: Efeito do estresse sobre o peso corporal dos animais resilientes ou suscetíveis.** Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; ANOVA de duas vias seguida do teste de Tuckey. As letras indicam diferença estatística entre os grupos (a) Não Estressados veículo *versus* Resilientes ( $p < 0,0001$ ) e (c) Resilientes *versus* susceptíveis ( $p < 0,0001$ ).

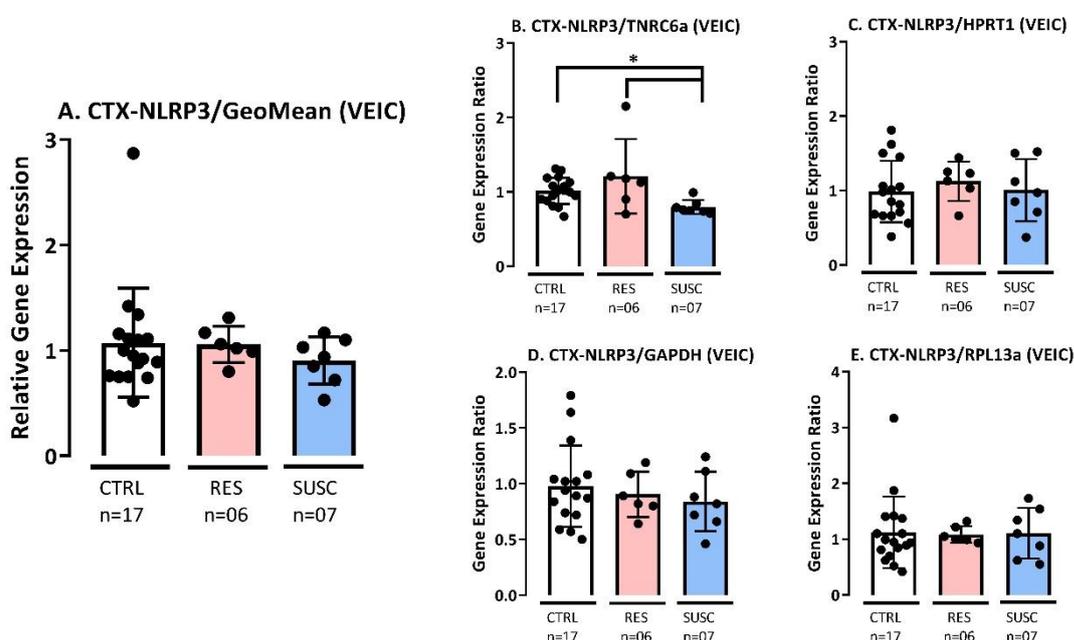
**3.6.3. Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7, inflamassoma NLRP3, caspase-1 e IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal, hipocampo dorsal e hipocampo ventral de animais classificados como resilientes ou suscetíveis.**

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de P2X7 no CPF dos animais resilientes ou suscetíveis quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=1,731; p= 0,4208; figura 12A), ou por TNRC6a (H=5,171; p= 0,0753; figura 12B), HPRT1 (H=0,4678, p=0,7914; figura 12C), GAPDH (H=1,041; p=0,5944; figura 12D), RPL13a (H=0,7807; p=0,6768; figura 12E).



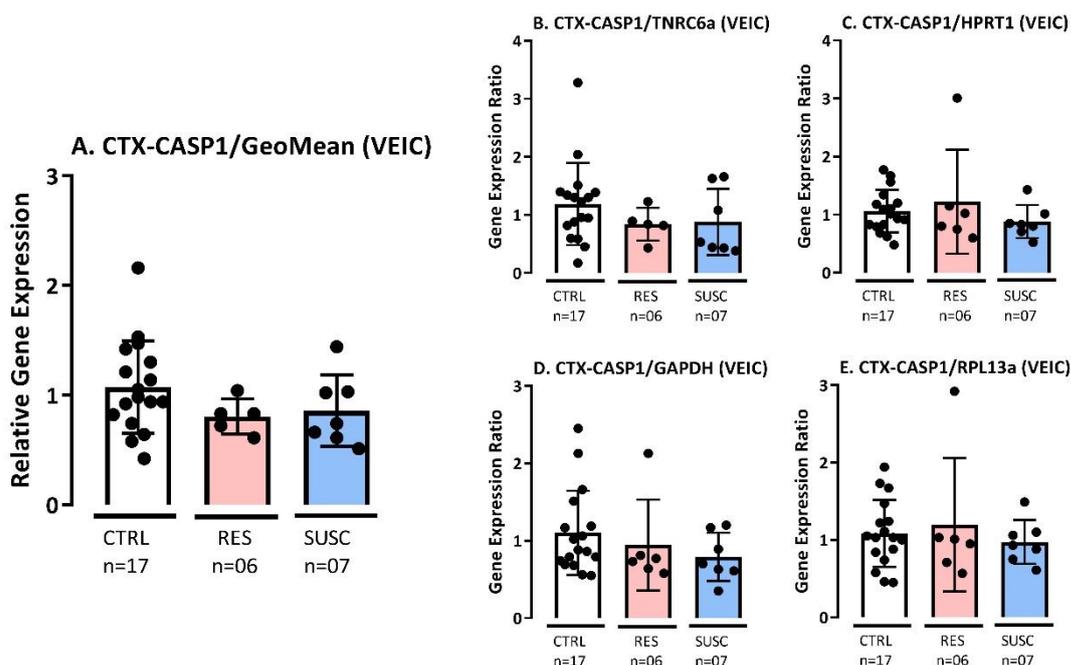
**Figura 12: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de P2X7 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de P2X7/TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de P2X7/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de P2X7/GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de P2X7/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (N.S.). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=susceptíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou que a expressão de NLRP3 no CPF, normalizada pelo gene de referência TNRC6a, de animais suscetíveis era menor do que a expressão deste mesmo gene em animais resilientes ou o grupo controle ( $H=8,119$ ;  $p=0,0357$ ; figura 13B). Não houve diferença significativa na expressão de NLRP3 no CPF quando normalizado por HPRT1 ( $H=0,9305$ ;  $p=0,6280$ ; figura 13C), GAPDH ( $H=0,5347$ ;  $p=0,7654$ ; figura 13D), RPL13a ( $H=0,3402$ ;  $p=0,8436$ ; figura 13E) ou média geométrica dos quatro genes de referência ( $H=1,302$ ;  $p=0,5214$ ; figura 13A).



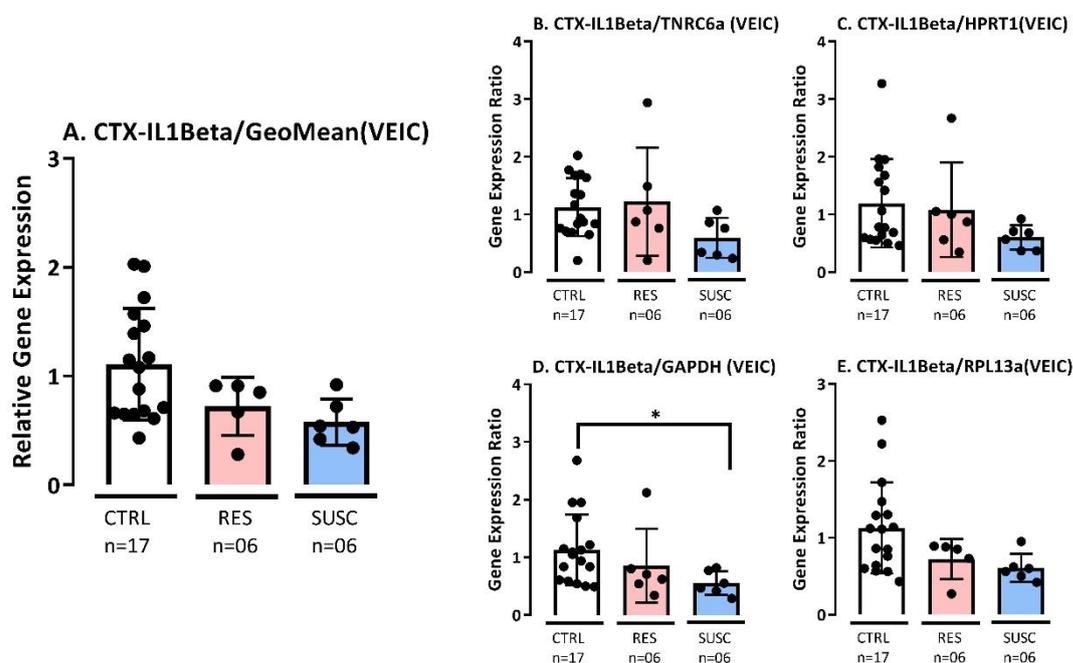
**Figura 13: Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de NLRP3 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de NLRP3/TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de NLRP3/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de NLRP3/GAPDH. E. Razão da expressão gênica de NLRP3/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18-06$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e o asterisco indica diferença significativa entre o grupo controle (não estressado veículo) e o grupo suscetível e entre o grupo suscetível e grupo resiliente ( $*p<0,05$ ). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=suscetíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de caspase-1 no CPF dos animais resilientes ou suscetíveis quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H= 2,640; p= 0,2672; figura 14A), ou por TNRC6a (H= 2,295; p= 0,3175; figura 14B), HPRT1 (H= 1,304, p= 0,5209; figura 14C), GAPDH (H= 1,982; p= 0,3711; figura 14D), RPL13a (H= 0,4118; p= 0,8139; figura 14E).



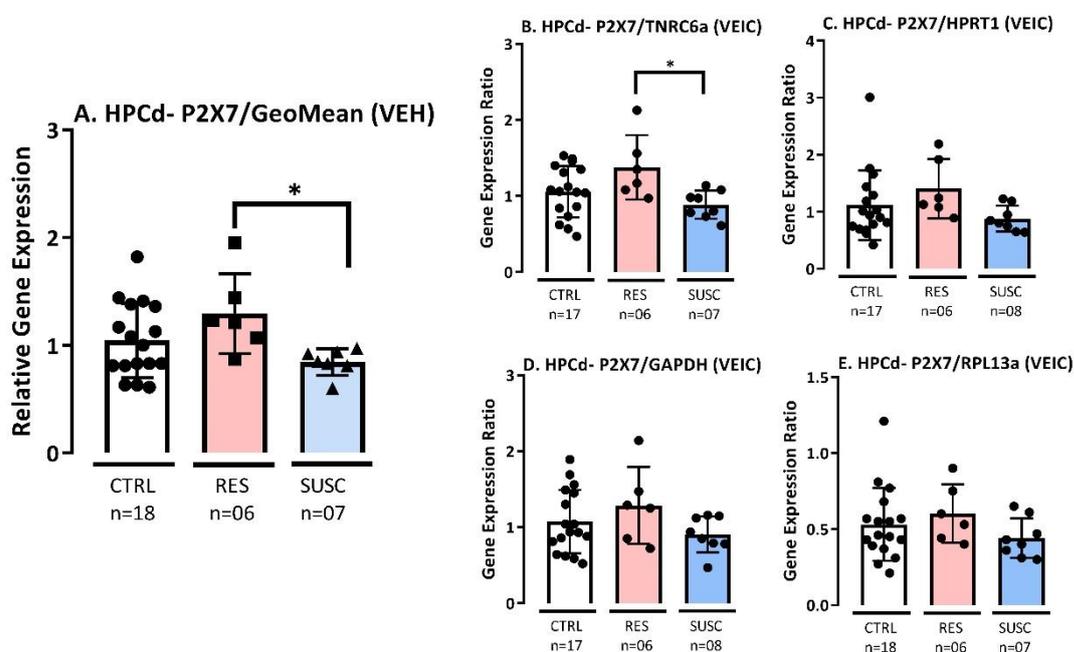
**Figura 14: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** **A.** Expressão gênica de casp-1 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de casp-1 /TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de casp-1/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de casp-1 /GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (N.S.). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=susceptíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou diferença significativa na expressão gênica de IL-1 $\beta$  no CPF, quando normalizada pelo gene de referência GAPDH, sendo a expressão menor em animais suscetíveis em relação à expressão em animais do grupo controle (H=7,114; p=0,0285; figura 15D). Não houve diferença significativa na expressão de IL-1 $\beta$  no CPF quando normalizado por HPRT1(H= 3,194; p= 0,2025; figura 15B), TNRC6a (H= 3,670; p= 0,1596; figura 15C), RPL13a (H= 5,860; p= 0,0534; figura 15E) ou média geométrica dos quatro genes de referência (H=5,931; p= 0,0515; figura 15A).



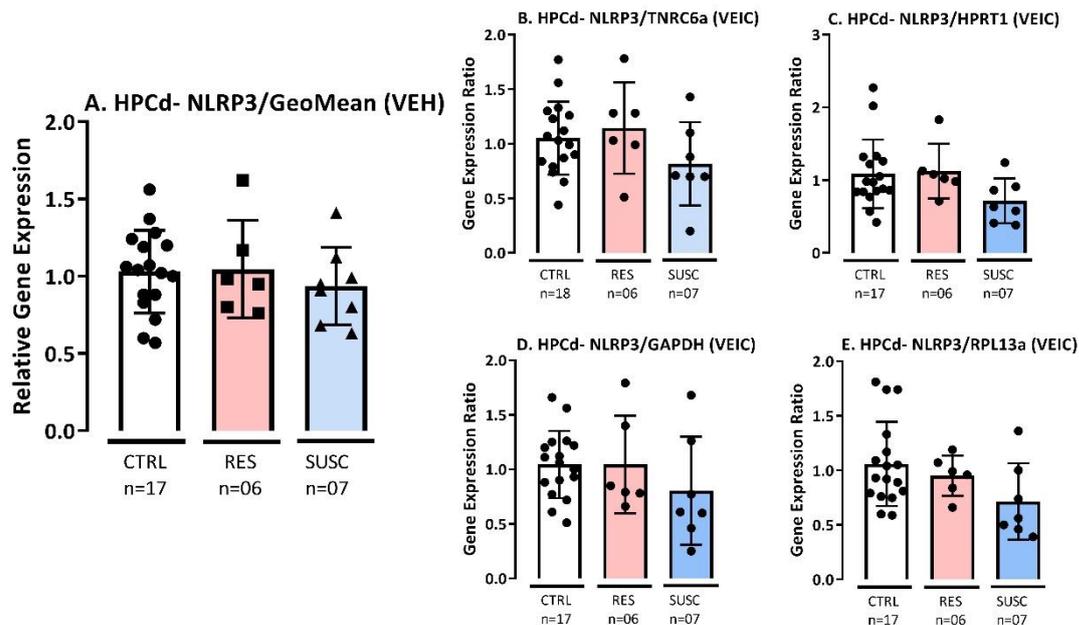
**Figura 15: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de IL-1 $\beta$  relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /HPRT1. D. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /GAPDH. E. Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e o asterisco indica diferença significativa entre o grupo suscetível e grupo controle (\*p<0,05). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=suscetíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou que expressão gênica de P2X7 no HPC dorsal, quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência, em animais suscetíveis é menor em relação à expressão gênica de P2X7 dos animais resilientes ( $H= 5,829$ ;  $p= 0,0487$ ; figura 16A). De maneira semelhante, a expressão de P2X7 no HPC dorsal de animais suscetíveis é menor do que a expressão em animais resilientes, quando normalizada pelo gene de referência TNRC6a ( $H= 5,939$ ;  $p= 0,0444$ ; figura 16B). Não houve diferença significativa na expressão de P2X7 no HPC dorsal quando normalizado por HPRT1 ( $H= 4,567$ ;  $p= 0,1019$ ; figura 16C), GAPDH ( $H= 2,053$ ;  $p= 0,3583$ ; figura 16D), RPL13a ( $H= 2,419$ ;  $p= 0,2984$ ; figura 16E).



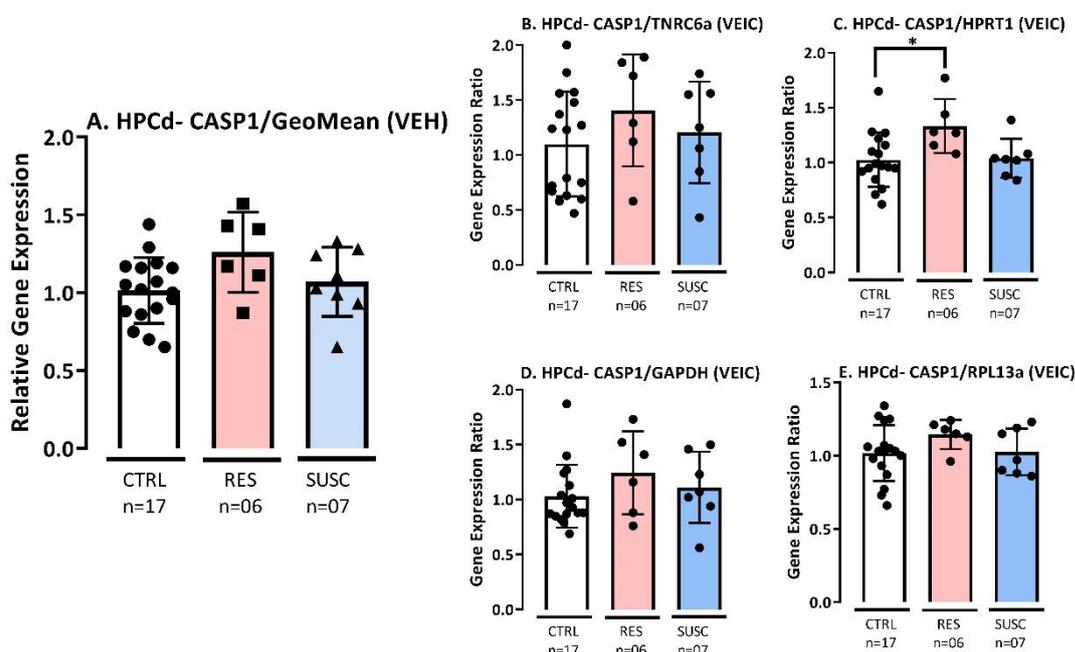
**Figura 16: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo dorsal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de P2X7 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de P2X7/TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de P2X7/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de P2X7/GAPDH. E. Razão da expressão gênica de P2X7/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e o asterisco indica diferença significativa entre o grupo suscetível e grupo resiliente ( $*p<0,05$ ). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=suscetíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de NLRP3 no HPC dorsal dos animais resilientes ou suscetíveis quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H= 0,9812; p= 0,6122; figura 17A), ou por TNRC6a (H= 2,667; p= 0,2636; figura 17B), HPRT1 (H= 4,756, p= 0,0927; figura 17C), GAPDH (H= 2,640; p= 0,2672; figura 17D), RPL13a (H= 4,782; figura 17D; p= 0,0915).



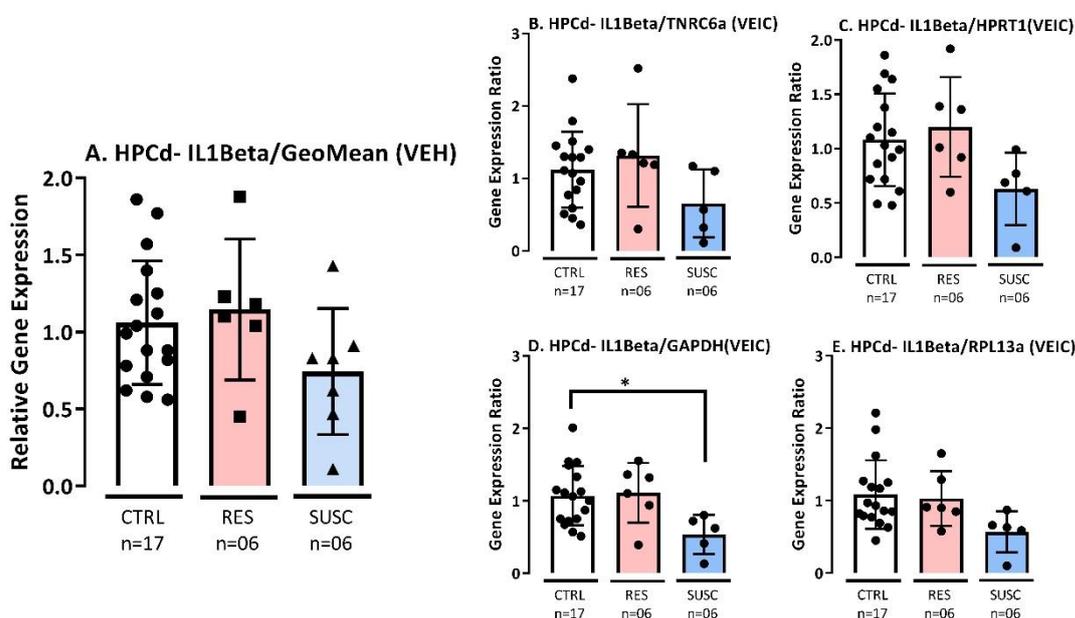
**Figura 17: Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo dorsal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de NLRP3 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de NLRP3/TNR6a. C. Razão da expressão gênica de NLRP3/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de NLRP3/GAPDH. E. Razão da expressão gênica de NLRP3/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=susceptíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou que expressão gênica de caspase-1 no HPC dorsal, quando normalizada pelo gene de referência HPRT1, em animais resilientes é maior em relação à expressão gênica de caspase-1 dos animais pertencentes ao grupo controle ( $H= 7,159$ ;  $p= 0,0276$ ; figura 18C). Não houve diferença significativa na expressão de caspase-1 no HPC dorsal quando normalizado por TNRC6a ( $H=1,646$ ;  $p=0,4392$ ; figura 18B), GAPDH ( $H= 2,336$ ;  $p=0,3110$ ; figura 18D) RPL13a ( $H=2,171$ ;  $p=0,3377$ ; figura 18E) ou média geométrica dos quatro genes de referência ( $H= 3,792$ ;  $p= 0,1502$ ; figura 18A).



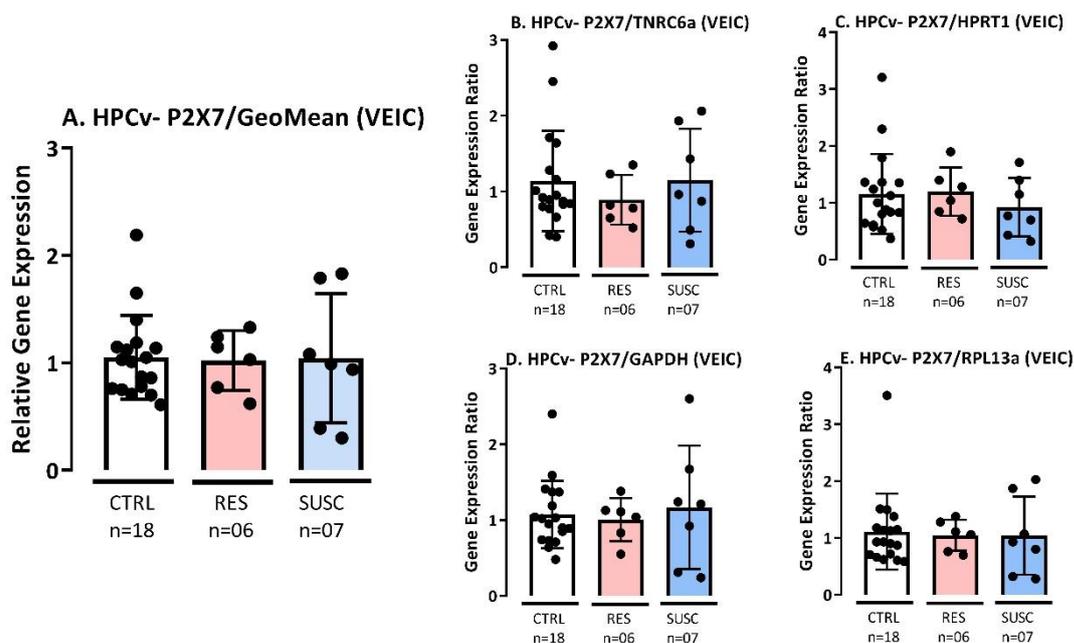
**Figura 18: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo dorsal resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de casp-1 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de casp-1 /TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de casp-1/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de casp-1 /GAPDH. E. Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e o asterisco indica diferença significativa entre o grupo resiliente e o grupo controle ( $*p<0,05$ ). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=suscetíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou que expressão gênica de IL-1 $\beta$  no HPC dorsal, quando normalizada pelo gene de referência GAPDH, em animais suscetíveis é menor em relação à expressão gênica de IL-1 $\beta$  dos animais pertencentes ao grupo controle (H=6,472; p=0,0393; figura 19D). Não houve diferença significativa na expressão de IL-1 $\beta$  no HPC dorsal quando normalizado por TNRC6a (H=4,390; p=0,1114; figura 19B), HPRT1 (H=4,528; p= 0,1039; figura 19C) RPL13a (H=5,764; p=0,0560; figura 19E) ou média geométrica dos quatro genes de referência (H= 3,111; p= 0,2111; figura 19A).



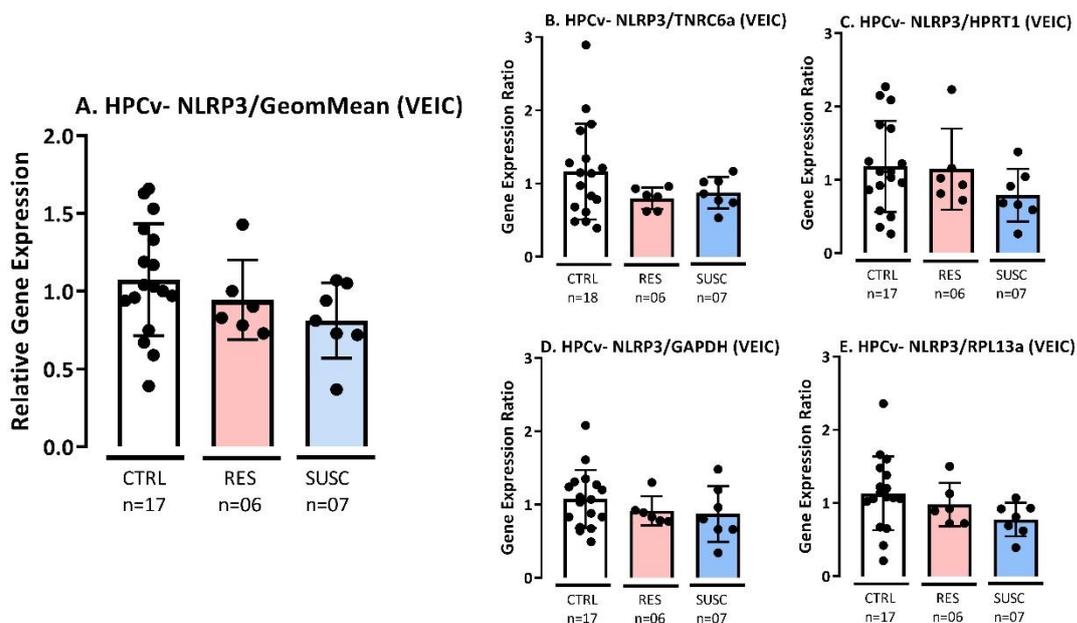
**Figura 19: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no hipocampo dorsal de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de IL-1 $\beta$  relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /HPRT1. D. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /GAPDH. E. Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e o asterisco indica diferença significativa entre o grupo resiliente e o grupo controle (\*p<0,05). Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=suscetíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de P2X7 no HPC ventral dos animais resilientes ou suscetíveis quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência ( $H=0,1325$ ;  $p=0,9359$ ; figura 20A), ou por TNRC6a ( $H=0,9270$ ;  $p=0,6291$ ; figura 20B), HPRT1 ( $H=1,359$ ,  $p=0,5068$ ; figura 20C), GAPDH ( $H=0,1891$ ;  $p=0,9098$ ; figura 20D), ou RPL13a ( $H=0,1477$ ;  $p=0,9288$ ; figura 20E).



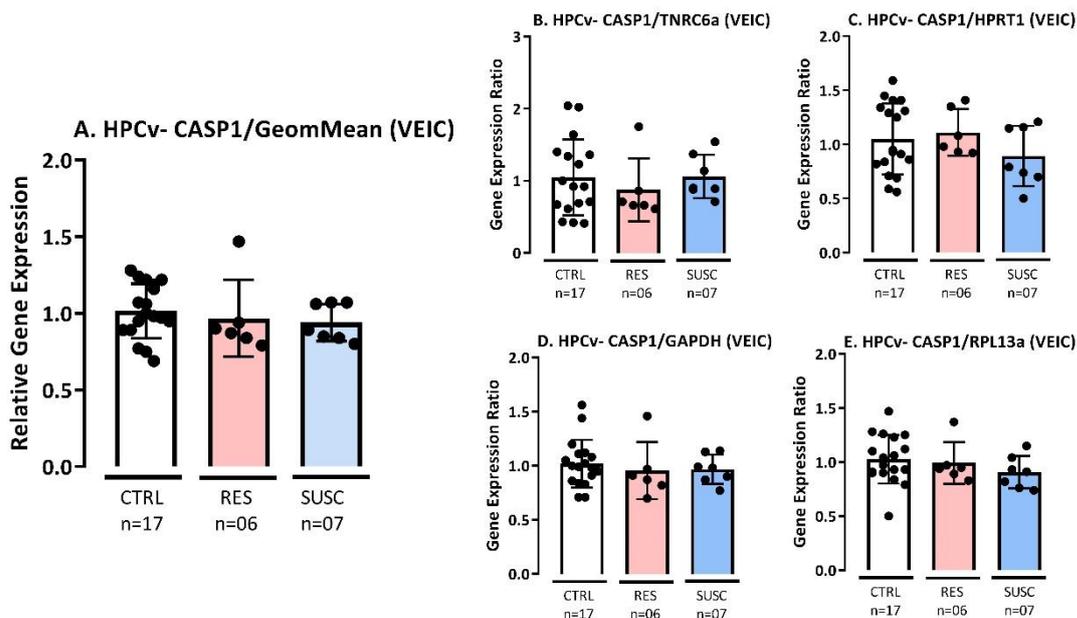
**Figura 20: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo ventral de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de P2X7 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de P2X7/TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de P2X7/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de P2X7/GAPDH. E. Razão da expressão gênica de P2X7/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=susceptíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de NLRP3 no HPC ventral dos animais resilientes ou suscetíveis quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência ( $H= 3,005$ ;  $p= 0,2225$ ; figura 21A), ou por TNRC6a ( $H=1,743$ ;  $p= 0,4184$ ; figura 21B), HPRT1 ( $H= 2,479$ ,  $p= 0,2895$ ; figura 21C), GAPDH ( $H= 1,715$ ;  $p= 0,4242$ ; figura 21D), ou RPL13a ( $H= 4,608$ ;  $p= 0,0999$ ; figura 21E).



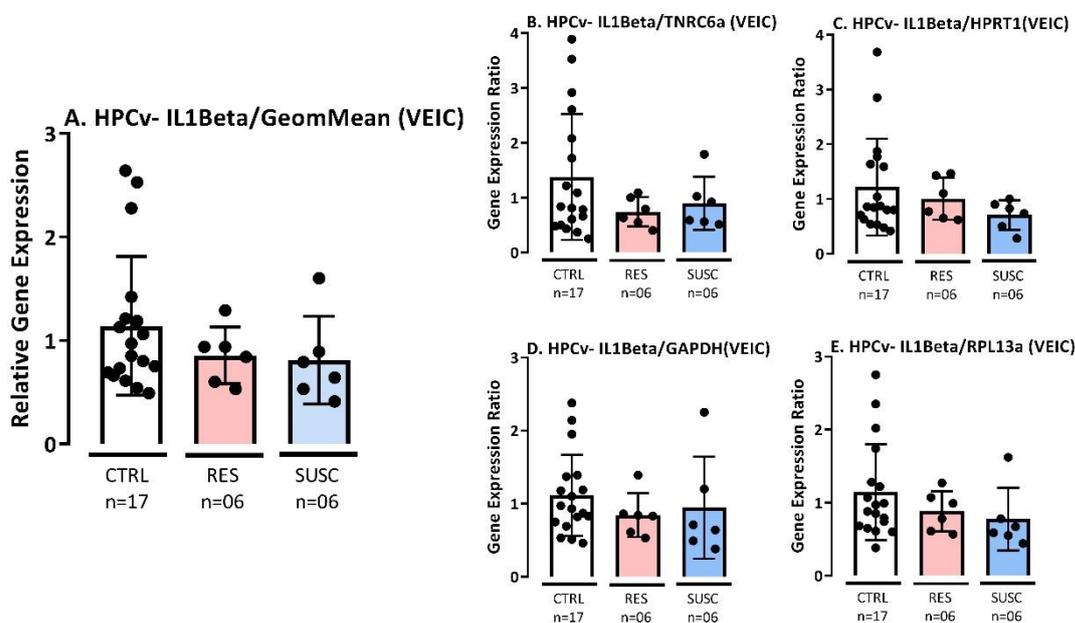
**Figura 21: Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo ventral de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de NLRP3 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de NLRP3/TNR6a. C. Razão da expressão gênica de NLRP3/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de NLRP3/GAPDH. E. Razão da expressão gênica de NLRP3/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=susceptíveis ao estresse.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de caspase-1 no HPC ventral dos animais resilientes ou suscetíveis quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=1,837; p=0,3990; figura 22A), ou por TNRC6a (H= 1,782; p= 0,4102; figura 22B), HPRT1 (H= 2,585, p= 0,2746; figura 22C), GAPDH (H= 1,409; p= 0,4945; figura 22D), ou RPL13a (H= 2,332; p= 0,3116; figura 22E).



**Figura 22: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo ventral resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de casp-1 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de casp-1 /TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de casp-1/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de casp-1 /GAPDH. E. Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com veículo; Resil=resilientes ao estresse; Suscep=suscetíveis ao estresse.

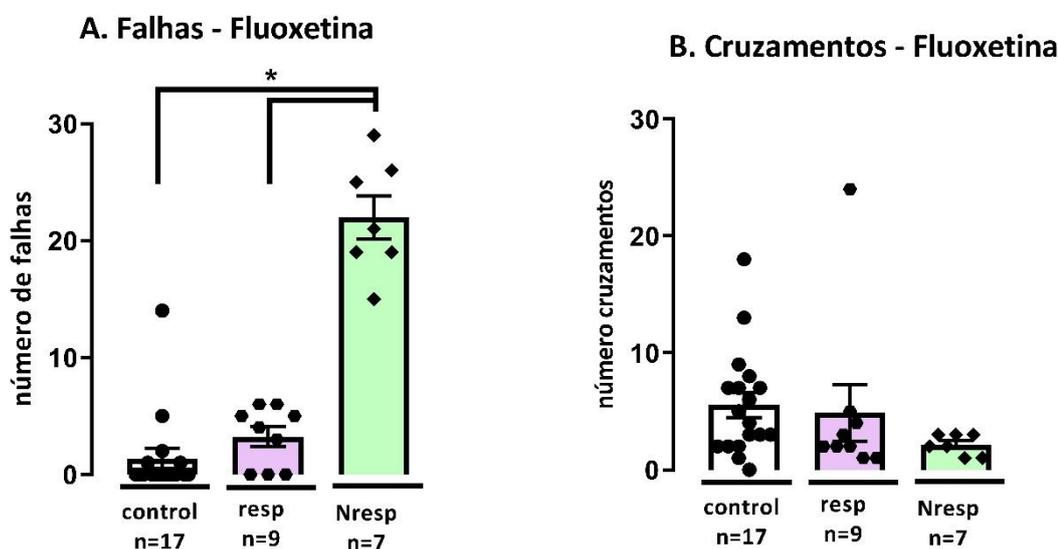
A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de IL-1 $\beta$  no HPC ventral dos animais resilientes ou suscetíveis quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H= 1,925; p= 0,3820; figura 23A), ou por TNRC6a (H= 0,7321; p= 0,6935; figura 23B), HPRT1 (H= 1,431, p= 0,4889; figura 23C), GAPDH (H= 1,638; p= 0,4408; figura 23D), ou RPL13a (H= 3,391; p= 0,1835; figura 23E).



**Figura 23: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no hipocampo ventral de ratos resilientes ou suscetíveis ao estresse do desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de IL-1 $\beta$  relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a

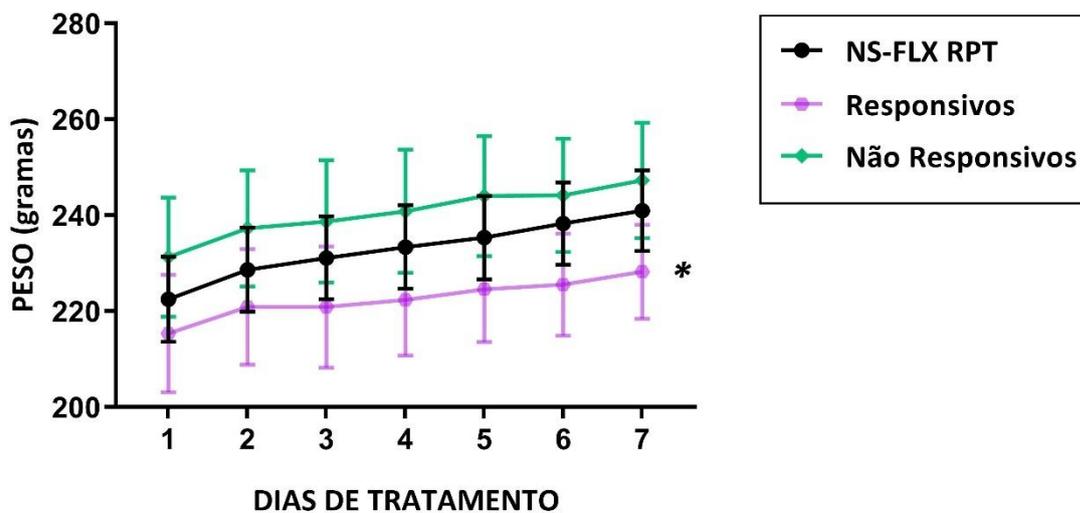
### 3.6.4. Efeito do tratamento repetido com fluoxetina em animais classificados como responsivos ou não responsivos.

O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, indicou diferença significativa no número de falhas. Como demonstrado na figura 24A, os animais do grupo responsivo apresentaram número de falhas maior quando comparados com os animais do grupo não responsivo ( $H= 20,13$ ;  $p= 0,0189$ ) e grupo controle ( $H= 20,13$ ;  $p<0,0001$ ). Não houve diferença significativa no número de cruzamentos em nenhum dos grupos ( $H= 4,688$ ;  $p= 0,0959$ ; figura 24B).



**Figura 24: Efeito do tratamento repetido com fluoxetina (10mg/kg) sobre o número de falhas e cruzamentos em animais submetidos ao desamparo aprendido.** Os animais foram classificados como responsivos quando apresentaram número de falhas menor ou igual a 10 e em não responsivos quando apresentaram número de falhas maior ou igual a 15. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=17 - 07$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. O asterisco indica diferenças significativas entre os grupos responsivo *versus* não responsivo e entre o grupo controle (não estressados fluoxetina) *versus* responsivo ( $*p<0,05$ ). Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento

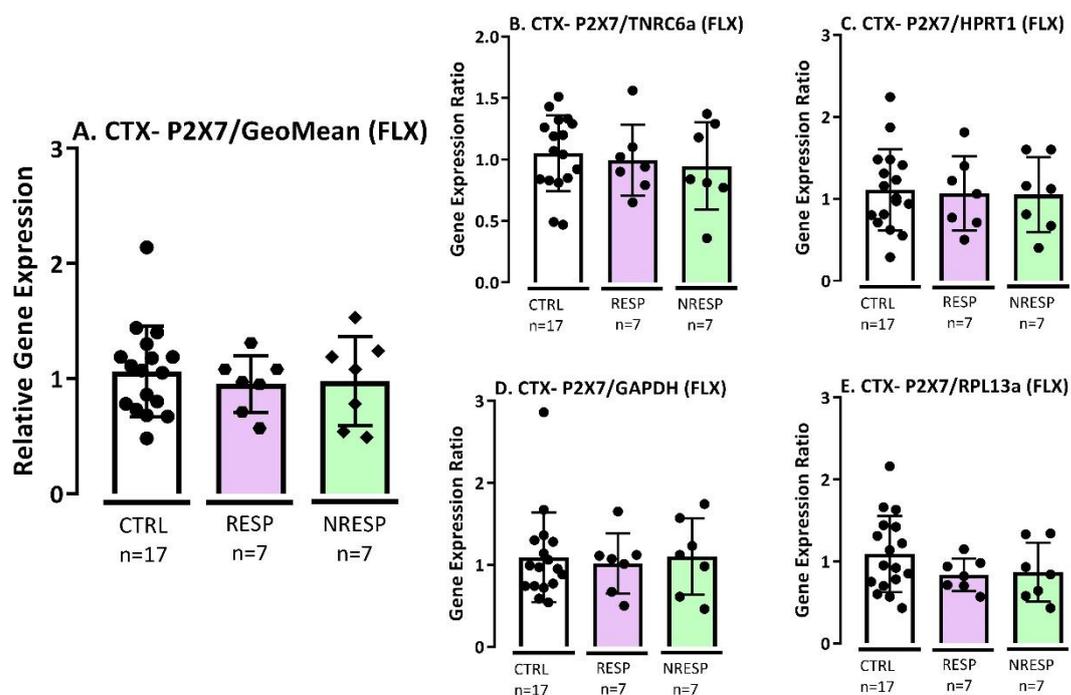
A ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou não haver interação entre os fatores dias de tratamento e condição ( $F_{(12, 186)}=0,5745$ ;  $p=0,8609$ ). Houve diferença significativa na tempo de tratamento ( $F_{(1,810, 56,09)}=28,99$ ;  $p<0,0001$ ) mas não na condição ( $F_{(2, 31)} = 0,5380$ ). O teste post-hoc de Tuckey indicou que os animais classificados como Responsivos apresentaram menor peso quando comparados com os animais do grupo Não Responsivos ( $p=0,0104$ ).



**Figura 25: Efeito do tratamento repetido com fluoxetina sobre o peso corporal dos animais responsivos ou não responsivos.** Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; ANOVA de duas vias seguida do teste de Tuckey. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo Responsivo e o grupo Não Responsivo ( $*p<0,05$ ).

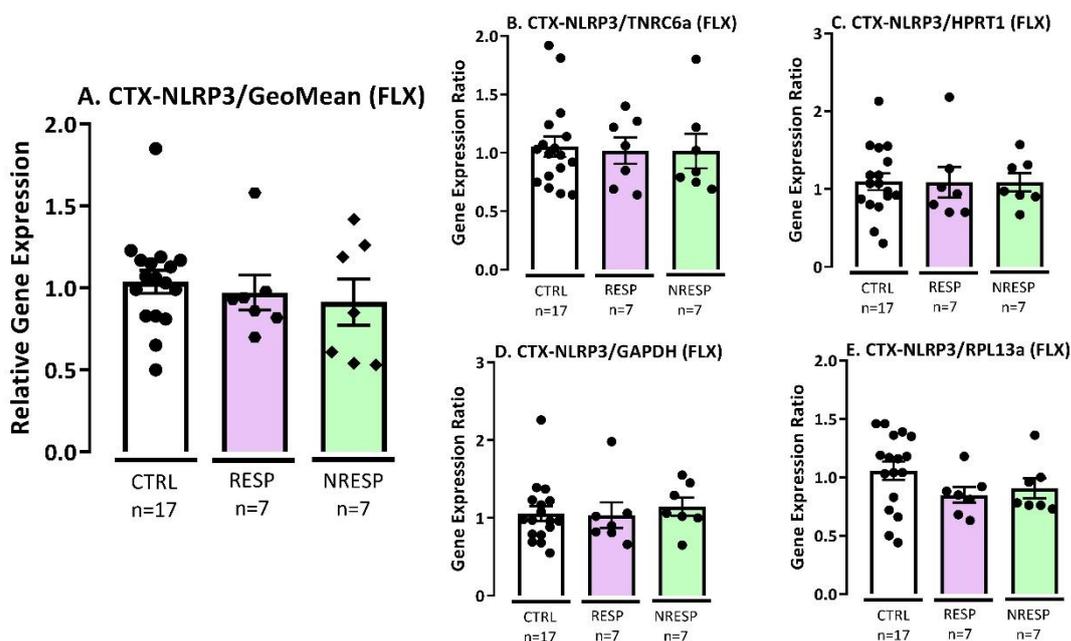
**3.6.5. Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7, inflamassoma NLRP3, caspase-1 e IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal, hipocampo dorsal e hipocampo ventral de animais classificados como responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina.**

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de P2X7 no CPF dos animais Responsivos ou Não Responsivos quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H= 0,3248; p=0,8501; figura 26A), ou por TNRC6a (H= 0,9193; p= 0,6315; figura 26B), HPRT1 (H=0,07204, p=0,9646; figura 26C), GAPDH (H= 0,1613; p=0,9225; figura 26D), RPL13a (H= 1,770; p= 0,4128; figura 26E).



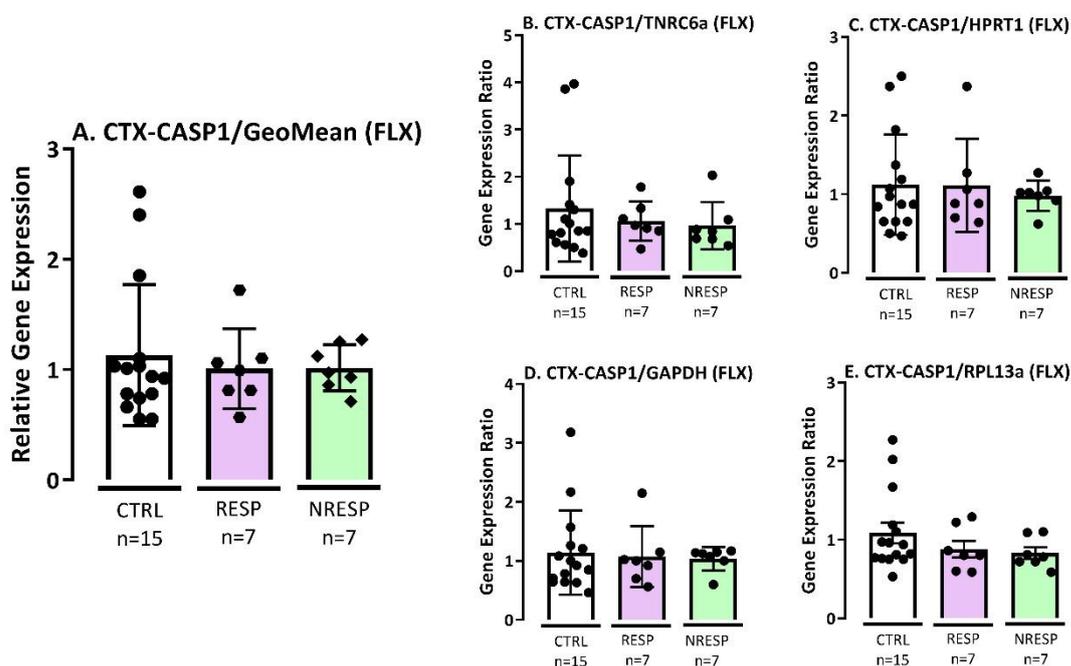
**Figura 26: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de P2X7 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de P2X7/TNR6a. **C.** Razão da expressão gênica de P2X7/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de P2X7/GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de P2X7/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=17 – 07; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de NLRP3 no CPF dos animais Responsivos ou Não Responsivos quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H= 0,8884; p= 0,6414; figura 27A), ou por TNRC6a (H= 0,2468; p= 0,8839; figura 27B), HPRT1 (H=0,3022, p=0,8598; figura 27C), GAPDH (H= 1,506; p= 0,4710; figura 27D), RPL13a (H= 3,280; p= 0,1939; figura 27E).



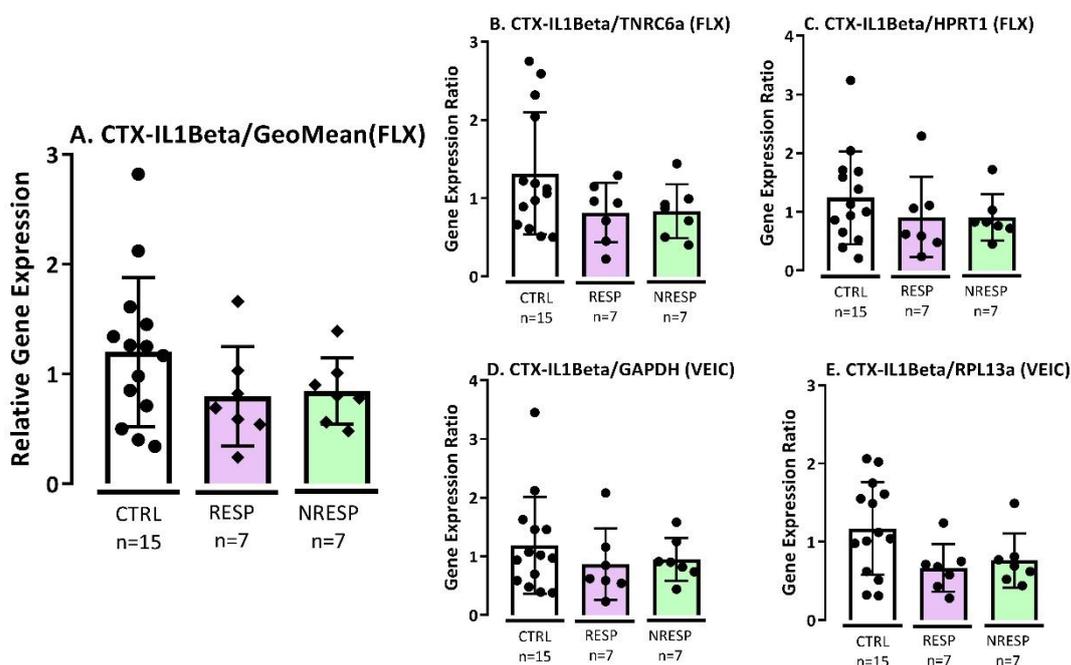
**Figura 27: Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de NLRP3 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de NLRP3/TNR6a. **C.** Razão da expressão gênica de NLRP3/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de NLRP3/GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de NLRP3/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=17 – 07; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de caspase-1 no CPF dos animais Responsivos ou Não Responsivos quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência ( $H=0,3610$ ;  $p=0,8349$ ; figura 28A), ou por TNRC6a ( $H=0,6743$ ;  $p=0,7138$ ; figura 28B), HPRT1 ( $H=1,304$ ,  $p=0,5209$ ; figura 28C), GAPDH ( $H=0,4184$ ;  $p=0,8112$ ; figura 28D), RPL13a ( $H=1,781$ ;  $p=0,4105$ ; figura 28E).



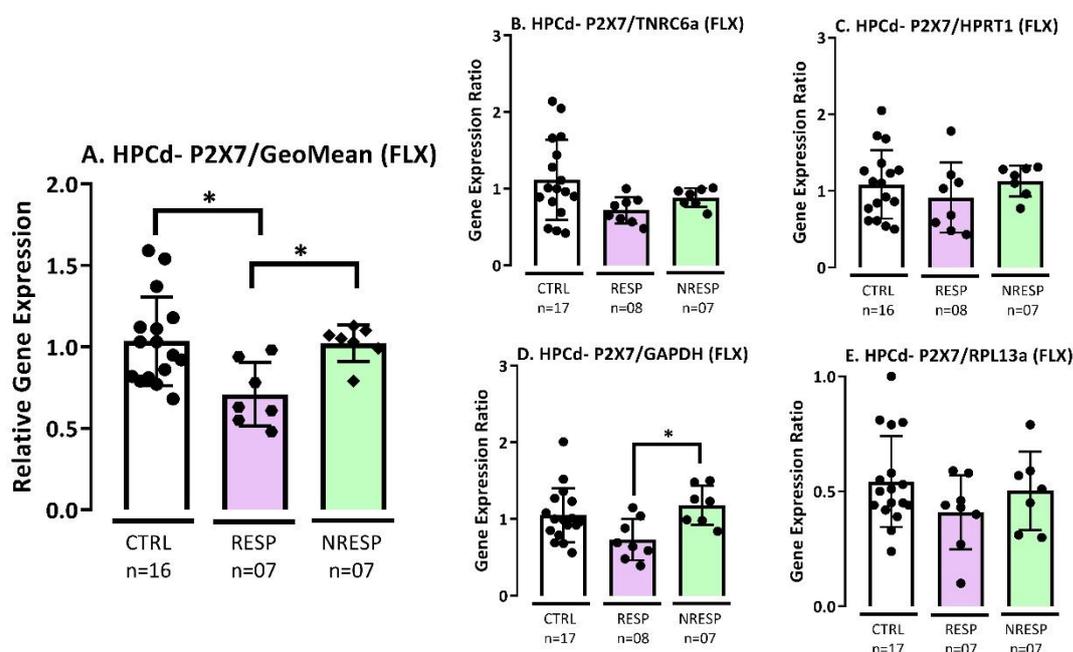
**Figura 28: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de casp-1 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de casp-1 /TNR6a. **C.** Razão da expressão gênica de casp-1/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de casp-1 /GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=17 - 07$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de IL-1 $\beta$  no CPF dos animais Responsivos ou Não Responsivos quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=2,367; p=0,3063; figura 29A), ou por TNRC6a (H=2,836; p=0,2423; figura 29B), HPRT1 (H=1,358, p=0,5072; figura 29C), GAPDH (H=1,165; p=0,5586; figura 29D), RPL13a (H=4,327; p=0,1149; figura 29E).



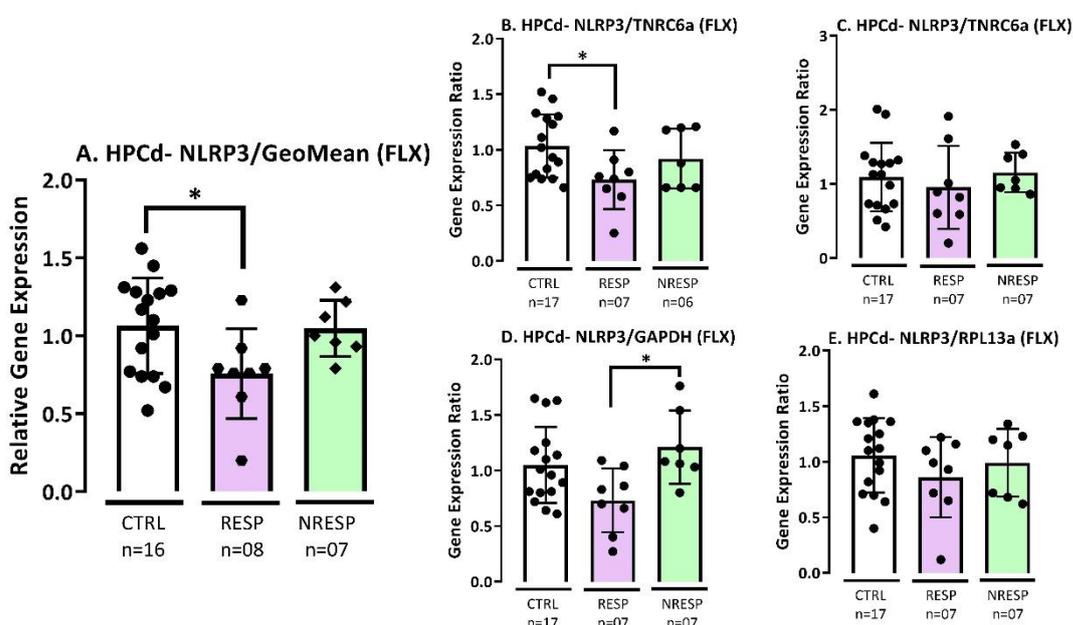
**Figura 29: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de IL-1 $\beta$  relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=17 – 07; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn, indicou que a expressão de P2X7 no HPC dorsal, normalizada pela média geométrica dos genes de referência, nos animais responsivos é menor quando comparada com os animais não responsivos ( $H= 9,332$ ;  $p= 0,0197$ ; figura 30A) e com os animais do grupo controle ( $H= 9,332$ ;  $p= 0,0191$ ; figura 30A). A expressão de P2X7 também foi menor no HPC dorsal dos animais responsivos em relação aos animais não responsivos, quando normalizada por GAPDH ( $H= 7,064$ ;  $p= 0,0315$ ; figura 30D). Não houve diferença na expressão de P2X7 em relação aos genes de referência TNRC6a ( $H=5,365$ ;  $p=0,0684$ ; figura 30B), HPRT1 ( $H=2,236$ ;  $p=0,3269$ ; figura 30C), ou RPL13a ( $H=1,726$ ;  $p=0,4220$ ; figura 30E).



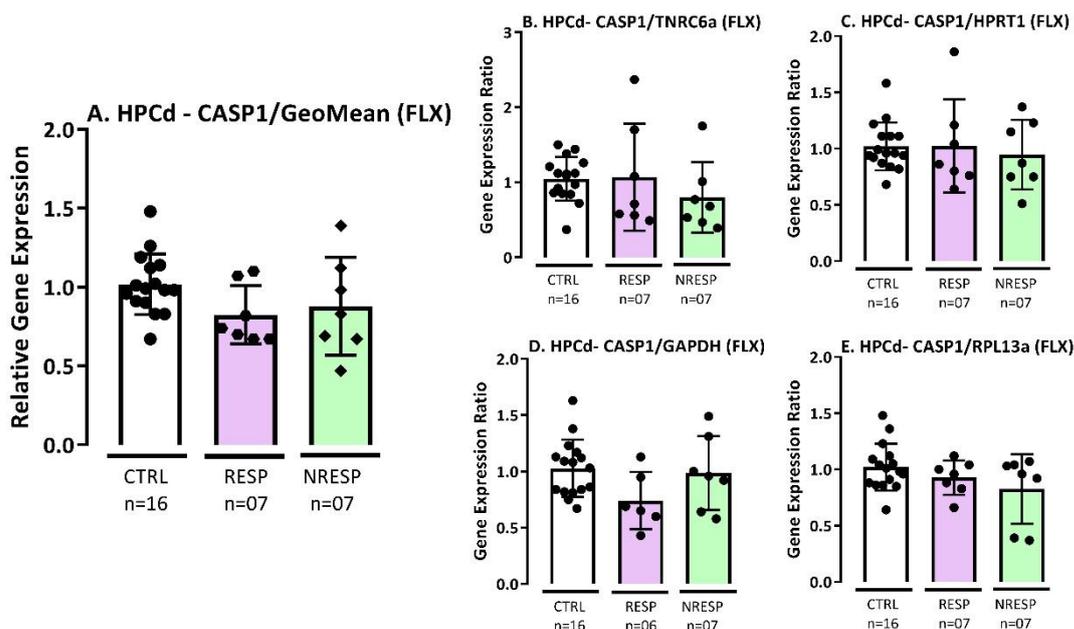
**Figura 30: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de P2X7 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de P2X7/TNR6a. C. Razão da expressão gênica de P2X7/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de P2X7/GAPDH. E. Razão da expressão gênica de P2X7/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo Responsivo e o grupo Não Responsivo e entre o grupo Responsivo e Controle ( $*p<0,05$ ). Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn, indicou que a expressão de NLRP3 no HPC dorsal, normalizada pela média geométrica dos genes de referência, nos animais responsivos é menor quando comparada com os animais do grupo controle (H=7,117; p=0,0271; figura 31A). A expressão de NLRP3 também foi menor no HPC dorsal dos animais responsivos em relação aos animais do grupo controle, quando normalizada por TNRC6a (H=6,699; p=0,0496; figura 31B), e menor do que o grupo não responsivo, quando normalizada por GAPDH (H=6,120; p= 0,0469; figura 31D). Não houve diferença na expressão de P2X7 em relação aos genes de referência HPRT1 (H=1,499; p=0,4727; figura 31C), ou RPL13a (H=1,642; p=0,4401; figura 31E).



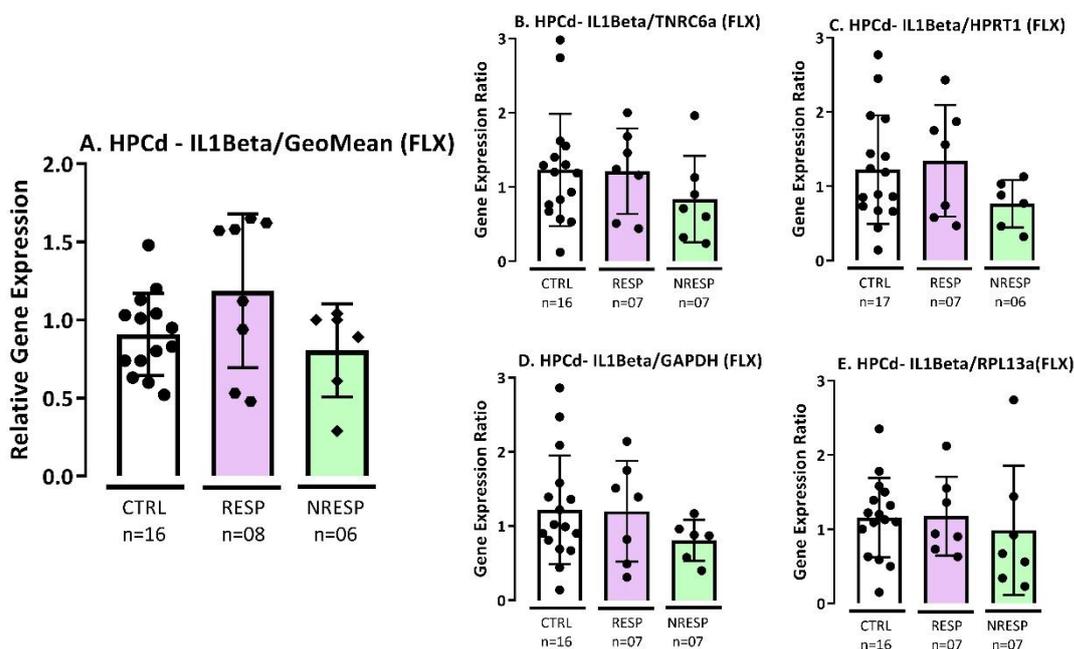
**Figura 31: Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.** **A.** Expressão gênica de NLRP3 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de NLRP3/TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de NLRP3/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de NLRP3/GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de NLRP3/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo Responsivo e o grupo Não Responsivo e entre o grupo Responsivo e Controle (\*p<0,05). Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de caspase-1 no HPC dorsal dos animais Responsivos ou Não Responsivos, quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=4,404; p=0,1106; figura 32A), ou por TNRC6a (H=3,438; p=0,1793; figura 32B), HPRT1 (H=0,7278, p=0,6950; figura 32C), GAPDH (H=4,099; p=0,1288; figura 32D), RPL13a (H=1,278; p=0,5279; figura 32E).



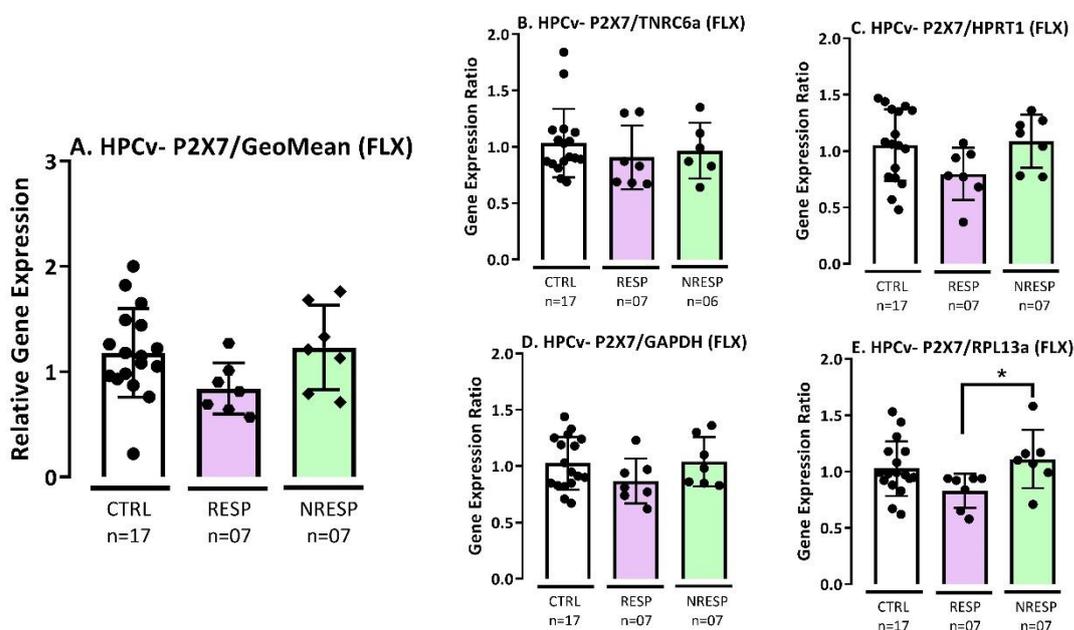
**Figura 32: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de casp-1 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de casp-1 /TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de casp-1/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de casp-1 /GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de IL-1 $\beta$  no HPC dorsal dos animais Responsivos ou Não Responsivos, quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=2,584; p=0,2747; figura 33A), ou por TNRC6a (H=2,264; p=0,3224; figura 33B), HPRT1 (H=2,007, p=0,3666; figura 33C), GAPDH (H=1,815; p= 0,4036; figura 33D), RPL13a (H=1,444; p=0,4858; figura 33E).



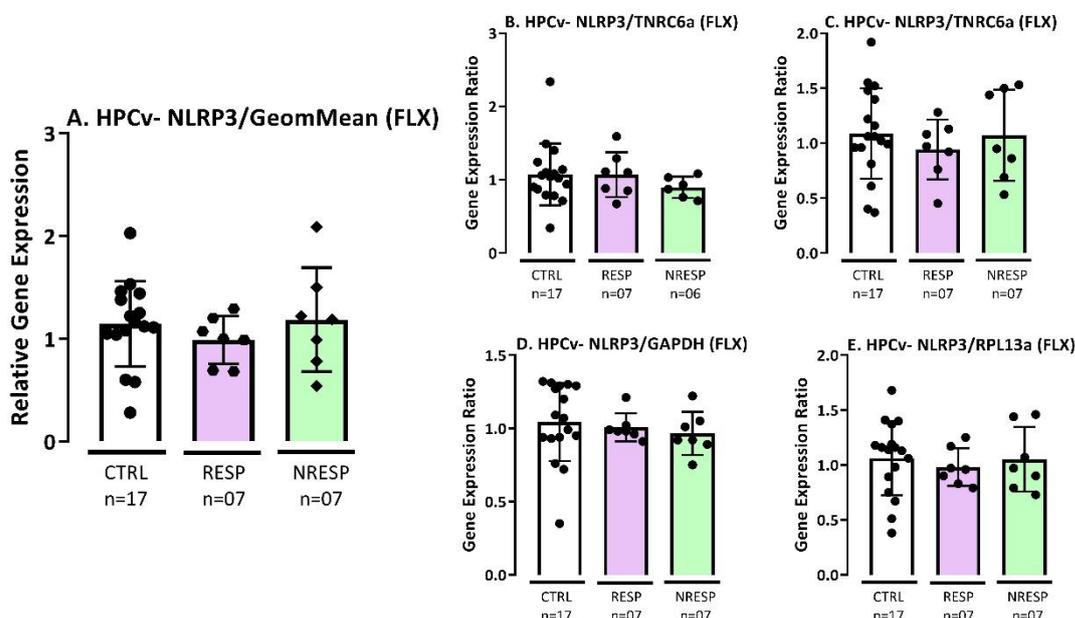
**Figura 33: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no hipocampo dorsal de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido. A.** Expressão gênica de IL-1 $\beta$  relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /TNR6a. **C.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou que os animais responsivos ao tratamento com FLX apresentam, no HPC ventral, expressão gênica de P2X7 menor que os animais não responsivos, quando normalizada pelo gene de referência RPL13a (H=7,534;  $p=0,0231$ ; figura 34E). No entanto, não há diferença significativa na expressão gênica de P2X7 no HPC ventral, quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=5,182;  $p=0,0749$ ; figura 34A), ou por TNRC6a (H=1,771;  $p=0,4125$ ; figura 34B), HPRT1 (H=4,113,  $p=0,1279$ ; figura 34C), GAPDH (H=3,361;  $p=0,186$ ; figura 34E).



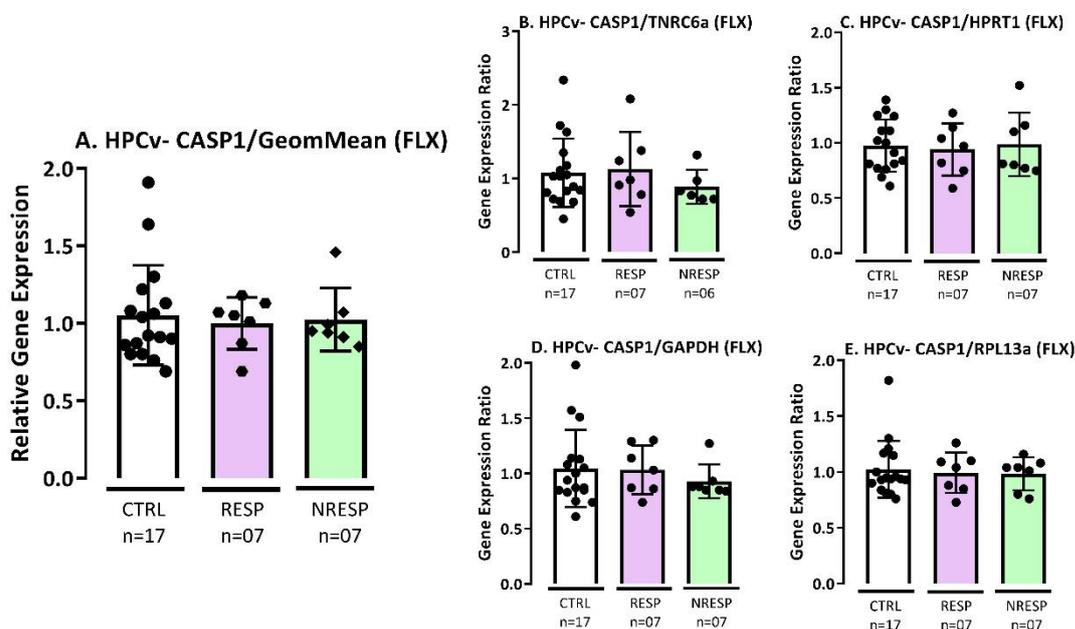
**Figura 34: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de receptores P2X7 no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.** **A.** Expressão gênica de P2X7 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de P2X7/TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de P2X7/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de P2X7/GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de P2X7/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=18 - 06$ ; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo Responsivo e o grupo Não Responsivo ( $*p<0,05$ ). Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de NLRP3 no HPC ventral dos animais Responsivos ou Não Responsivos, quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=1,406; p=0,4950; figura 35A), ou por TNRC6a (H=1,937; p=0,3797; figura 35B), HPRT1 (H=0,6500, p=0,7225; figura 35C), GAPDH (H=1,867; p=0,3932; figura 35D), RPL13a (H=0,7596; p=0,5498; figura 35E).



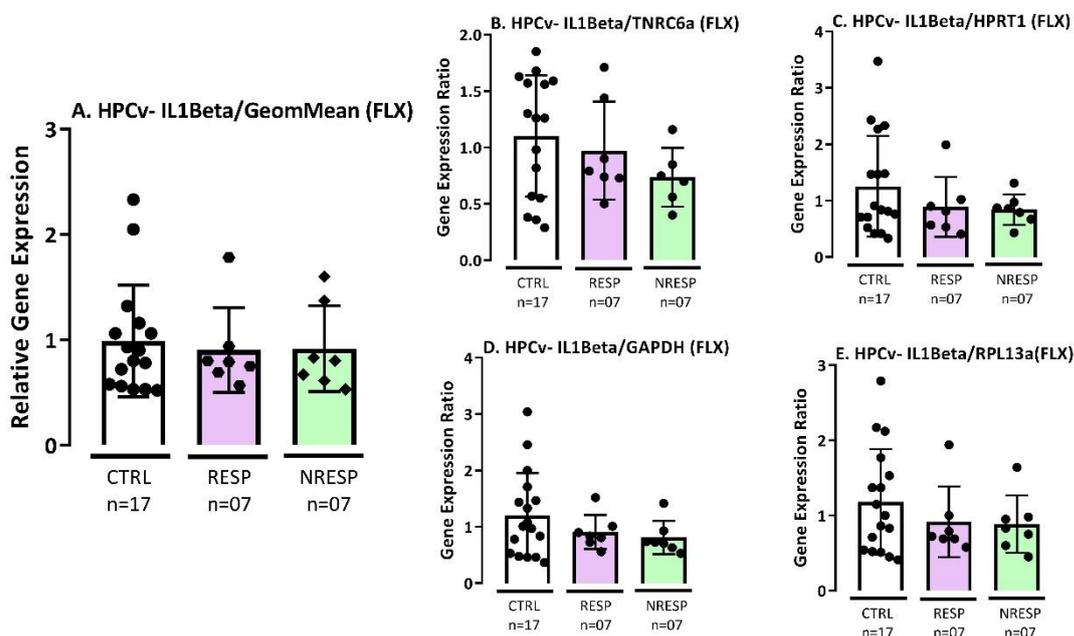
**Figura 35: Efeito do estresse sobre a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de NLRP3 relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de NLRP3/TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de NLRP3/HPRT1. D. Razão da expressão gênica de NLRP3/GAPDH. E. Razão da expressão gênica de NLRP3/RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de caspase-1 no HPC ventral dos animais Responsivos ou Não Responsivos, quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=0,09893; p=0,9517; figura 36A), ou por TNRC6a (H=1,345; p=0,5103; figura 36B), HPRT1 (H=0,1031, p=0,9497; figura 36C), GAPDH (H=0,7308; p=0,6939; figura 36D), RPL13a (H=0,01507; p=0,9925; figura 36E).



**Figura 36: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de caspase-1 no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.** **A.** Expressão gênica de casp-1 relativa à média geométrica dos genes de referência. **B.** Razão da expressão gênica de casp-1 /TNRC6a. **C.** Razão da expressão gênica de casp-1/HPRT1. **D.** Razão da expressão gênica de casp-1 /GAPDH. **E.** Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

A análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, indicou não haver diferença significativa na expressão gênica de IL-1 $\beta$  no HPC ventral dos animais Responsivos ou Não Responsivos, quando normalizada pela média geométrica dos genes de referência (H=0,01558; p=0,9922; figura 37A), ou por TNRC6a (H=1,976; p=0,3723; figura 37B), HPRT1 (H=0,5762, p=0,7497; figura 37C), GAPDH (H=1,545; p=0,4619; figura 37D), RPL13a (H=0,7310; p=0,6938; figura 37E).



**Figura 37: Efeito do estresse sobre a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no hipocampo ventral de ratos responsivos ou não responsivos ao tratamento repetido com fluoxetina e submetidos ao desamparo aprendido.** A. Expressão gênica de IL-1 $\beta$  relativa à média geométrica dos genes de referência. B. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /TNRC6a. C. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /HPRT1. D. Razão da expressão gênica de IL-1 $\beta$  /GAPDH. E. Razão da expressão gênica de casp-1 /RPL13a. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média; n=18 – 06; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Control=grupo não estressado tratado com fluoxetina; Resp=responsivos ao tratamento; Nresp=Não responsivos ao tratamento.

### 3.7. Discussão - Estudo 1

O modelo de desamparo aprendido, desenvolvido por Maier e Seligman em 1967, baseia-se em duas características: imprevisibilidade e incontrolabilidade do estresse, que prejudicam o aprendizado dos comportamentos de fuga ou escape dos animais durante a situação de teste (SELIGMAN; MAIER, 1967). Neste contexto, o tratamento com antidepressivos é capaz de prevenir o déficit comportamental, fazendo com que o número de falhas ou a latência em fugir ou escapar dos choques seja menor (SHERMAN; PETTY, 1980). Fatores como linhagem dos animais, o tempo de tratamento, e a classe do antidepressivo influenciam nos resultados. Uma das linhagens mais utilizadas em modelos animais é a linhagem Wistar, que apresenta diversas sub-linhagens, cada uma com particularidades definidas primariamente pelo tipo de cruzamento através do qual a linhagem foi gerada. Ratos Wistar, Wistar Hannover e Wistar Unilever são sub-linhagens heterogêneas (em inglês, *outbred*) obtidas através de cruzamentos não consanguíneos, visando a maior variabilidade genética, enquanto as sub-linhagens Wistar Kyoto e Wistar Furth são compostas por animais isogênicos (em inglês, *inbred*), originados através de cruzamentos entre irmãos, ou pais e filhos (ANDRADE et al, 2006; FAQI et al, 2017). No presente trabalho, utilizamos a sub-linhagem Wistar Hannover, recém implementada no campus de Ribeirão Preto quando do início do projeto. Com origem em Hannover (Alemanha) em 1989 e posteriormente transferida a outros institutos como Harlan Institute e Charles River Laboratories, o Wistar Hannover apresenta como características principais um menor ganho de peso corporal e uma maior expectativa de vida em relação à outras linhagens de ratos (FOSTER; FROST, 2018), características estas que contribuíram para o uso extensivo da linhagem em pesquisas nas áreas de toxicologia e farmacologia. Diversos estudos demonstraram a influência do fornecedor nos resultados obtidos com uma mesma linhagem. Machos Wistar provenientes de 5 fornecedores diferentes foram submetidos ao teste *Multivariate Concentric Square Field™*, desenvolvido para investigação de comportamentos como avaliação de risco, ansiedade e busca por abrigo, e apresentaram diferenças significativas no perfil comportamental para avaliação e tomada de riscos, além de tamanho e ganho de peso corporal (PALM et al., 2011). Em outro estudo, foi possível observar

a diferença de resiliência e vulnerabilidade em animais provenientes de diferentes fornecedores e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (THEILMANN et al., 2016). Estes dados corroboram os primeiros resultados do presente trabalho, uma vez que a diferença de peso corporal da sub-linhagem Wistar Hannover foi a característica primária que observamos ao comparar com a linhagem anteriormente fornecida pelo Biotério Central do campus. Apesar de não termos realizado experimentos comparando as duas linhagens diretamente, foi possível observar empiricamente que animais com a mesma idade diferiram em cerca de 200 gramas entre uma linhagem e outra, sendo a Wistar Hannover menor e o ganho de peso mais discreto. Além disso, a heterogeneidade nos resultados comportamentais também foi uma característica que surpreendeu na linhagem Wistar Hannover. Animais com a mesma idade, mesmas condições de alojamento e manuseio, submetidos ao mesmo protocolo experimental e ao mesmo tratamento farmacológico apresentaram comportamentos variados, como observamos em nosso primeiro experimento (figura 6). A heterogeneidade de comportamentos é bastante documentada em comportamento animal, sendo, inclusive, uma ferramenta para o estudo das diferenças individuais entre animais que apresentam ou não determinado comportamento, ou se desenvolvem ou não determinadas características, conseqüentes da exposição ao estresse, como, por exemplo, alterações na atividade locomotora, na ingestão de alimentos, na interação social, em comportamentos exploratórios e em tarefas que exigem cognição e aprendizado (CURÉ; ROLINAT, 1992; DUCLOT et al., 2011; MARTIS et al., 2018; YAU; POTENZA, 2013).

Apesar de não ser o objetivo primário deste trabalho, a heterogeneidade nos resultados comportamentais possibilitou que investigássemos alguns aspectos da resiliência e suscetibilidade ao estresse nestes animais. Resiliência pode ser definido como a capacidade de evitar as conseqüências negativas (sociais, psicológicas e fisiológicas) de uma exposição ao estresse capaz de comprometer o bem-estar físico e/ou emocional (RUSSO et al., 2012). Assim, a resiliência é um fenômeno ativo e adaptativo e não apenas a inexistência das respostas patológicas moleculares e comportamentais que ocorrem nos indivíduos suscetíveis (FEBBRARO et al., 2017). Em animais, estratégias ativas e

estratégias passivas de enfrentamento ao estresse são utilizadas para caracterizar animais resilientes ou suscetíveis. Estratégias ativas são tentativas comportamentais e cognitivas de lidar diretamente com o estressor e seus efeitos, enquanto que estratégias passivas focam justamente em evitar o enfrentamento da situação estressora, sendo frequentemente utilizadas quando há a compreensão de que as circunstâncias básicas não podem ser alteradas e, portanto, devem ser aceitas passivamente como são (BLALOCK; JOINER, 2000). Nesse contexto, as falhas em fugir ou escapar dos choques caracterizam uma estratégia de enfrentamento passivo e, contrariamente, as fugas e esquivas fazem parte da estratégia ativa de enfrentamento ao estresse, embasando nossa separação em animais resilientes e suscetíveis ao estresse dos choques.

Alterações no eixo HPA, no sistema imune e na resposta a antidepressivos já foram reportadas como sendo diferentes em animais classificados como resilientes e suscetíveis. Animais que exibem estratégias passivas apresentam maior reatividade do eixo HPA frente às situações estressoras, ou seja, em condições basais animais “passivos” apresentam níveis mais baixos de corticosterona quando comparados com animais “ativos”, porém, ao serem expostos a uma situação estressora, o aumento dos níveis deste hormônio é mais acentuado nos animais passivos, tornando-os mais suscetíveis aos efeitos do estresse. De maneira complementar, animais “ativos” não só apresentam menor ativação do eixo HPA quando expostos a eventos estressores, como também retornam aos níveis basais de liberação de corticosterona mais rapidamente (FRANK et al., 2006; HERMAN et al., 2016; VEENEMA et al., 2006). Essa ativação diferente do eixo HPA parece se refletir na ativação do sistema imune, uma vez que animais classificados como resilientes apresentam produção reduzida de IL-1 $\beta$  e IL-6 e cérebro (WOOD; BHATNAGAR, 2015), enquanto que animais classificados como suscetíveis apresentam maiores níveis periféricos destas mesmas citocinas pró-inflamatórias (HODES et al., 2014). No presente trabalho, apesar de não obtermos diferença estatisticamente significativa quando os genes de interesse foram normalizados pela média geométrica dos genes de referência, é possível observar nos animais resilientes uma maior expressão de NLRP3 no CPF e de caspase-1 no HPCd (figura 13 e figura 18, respectivamente), enquanto que nos animais suscetíveis a tendência é uma menor

expressão de IL-1 $\beta$  em ambas as estruturas cerebrais (figura 13 e figura 18, respectivamente). Embora esses resultados sejam contraditórios à teoria neuroimune (ou neuroinflamatória) que prediz que a depressão pode ser consequência de um estado inflamatório decorrente da hiperativação do eixo HPA e, portanto, animais suscetíveis apresentariam níveis elevados de componentes da cascata inflamatória, mecanismos moleculares compensatórios podem ser a causa da aparente diminuição dos níveis gênicos de IL-1 $\beta$  no CPF e HPCd dos animais suscetíveis, enquanto que animais resilientes expressaram aumento de NLRP3 e caspase-1. No processo de regulação gênica, o feedback negativo possibilita a diminuição da expressão de genes em resposta ao aumento da concentração de seu produto final, a proteína (COOPER, 2000). Processos como desacetilação de histonas, que é importante na atenuação da inflamação (VILLAGRA; SOTOMAYOR; SETO, 2010) e regulação da expressão dos componentes da cascata de NLRP3 por miRNA foram descritos a doença de Parkinson de maneira a proteger os neurônios dopaminérgicos (SINGH, 2011; WAN et al., 2018). Apesar de ser uma doença neurodegenerativa e apresentar particularidades deste tipo de patologia, mecanismos celulares de inflamação são comuns e compartilhados em diversas neuropatologias, sendo, portanto, passível de acontecer em doenças e distúrbios não relacionados diretamente (BLOKHIN et al., 2020; SMAIL et al., 2021). Assim, os dados moleculares do presente trabalho, apesar de se apresentarem contraditórios aos dados da literatura, também podem ser resultado de mecanismos celulares compensatórios ou neuroprotetores. Uma limitação importante em nossos resultados é a ausência da análise proteica dos componentes estudados, o que possibilitaria uma comparação direta com os níveis de expressão gênica e conclusões mais assertivas. Embora fosse um dos objetivos iniciais do trabalho, a análise proteica através de western blotting não foi bem-sucedida, mesmo após diversas tentativas com protocolos e técnicas diferentes. Além das dificuldades inerentes à técnica, anticorpos para NLRP3, caspase-1 e IL-1 $\beta$  com reatividade para rato são relativamente novos e quase sempre não específicos, apresentando reatividade também para outras espécies como camundongos, coelhos e até mesmo humanos. Outra questão a ser considerada é o tecido utilizado. Tecidos como fígado e pulmão, apresentaram melhor reatividade no datasheet dos anticorpos testados (Invitrogen® e

ABCAM®), quando comparados com o cérebro, tecido utilizado no presente trabalho. Adicionalmente, é necessário considerar a maneira de extração utilizada, o tampão RIPA. A lise celular é o processo inicial de preparação das amostras para técnicas moleculares sendo a escolha do tampão, determinante para uma boa extração proteica. Reconhecidamente como um tampão eficiente, o RIPA é constituído de ácidos e detergentes que permitem a extração e solubilização de proteínas, evitando a degradação das mesmas e interação com outras proteínas (CLÉMENT et al., 2012). No entanto, algumas proteínas são mais sensíveis à presença de detergentes e ácidos, sendo passíveis de desnaturação e perda de estabilidade e atividade (MATAR-MERHEB et al., 2011). Todos estes fatores (tecido, anticorpo e método de extração) podem ter impactado na análise proteica, tornando-a impraticável no presente estudo.

Assim como o observado na clínica, o tratamento agudo com antidepressivos monoaminérgicos não é capaz de induzir efeito terapêutico em animais submetidos ao desamparo aprendido, característica que contribui para a validade preditiva do modelo (SHERMAN; SACQUITNE; PETTY, 1982). Estudos demonstram que o tempo de 07-21 dias de tratamento é necessário para reverter a perda de sinapses e espinhos dendríticos no hipocampo, consequentes da exposição a choques inescapáveis, além de ser capaz de diminuir o número de falhas dos animais, indicando que esse remodelamento do hipocampo é um mecanismo estrutural importante para as respostas comportamentais (HAJSZAN et al., 2009). De maneira condizente com a literatura, nossos resultados também mostraram que o tratamento agudo não é capaz de induzir efeito antidepressivo nos animais (figura 06). Para os animais tratados repetidamente com fluoxetina, além da pronunciada heterogeneidade de comportamentos, também foi possível observar alterações no ganho de peso corporal (figuras 07, 08 e 09). A perda de peso corporal como efeito colateral do tratamento com fluoxetina é bastante documentada na literatura e ocorre tanto em ratos e camundongos (ARNDT; PETERSON; CAIN, 2015; D'SOUZA 2004; CALLAHAN et al., 2000), quanto em humanos (BRAMBILLA et al., 2005; SERRETTI; MANDELLI, 2010). O mecanismo de ação exato ainda é desconhecido, mas alguns estudos apontam que a perda de peso após tratamento crônico com fluoxetina é resultado da inibição

do consumo de carboidratos (WEISS et al., 1991) e da interação do fármaco com a leptina, hormônio secretado pelos adipócitos que participa dos mecanismos de ingestão de comida (GAMARO et al., 2008). Ambos processos interagem com a neurotransmissão serotoninérgica no sistema límbico, aumentando a liberação desta monoamina, (FINN et al., 2001; TELLES; GUIMARÃES; RIBEIRO, 2003; WURTMAN; WURTMAN, 1995), o que pode explicar, a redução de peso corporal observado nos animais após tratamento repetido com fluoxetina e sendo o peso corporal um parâmetro fisiológico da ação da fluoxetina sobre os animais.

O mecanismo de ação dos antidepressivos é um fator que também influencia nos resultados dos testes com modelo animal de desamparo aprendido. Apesar de serem a primeira escolha na clínica, os ISRS apresentam resultados controversos em modelos animais. O tratamento repetido com escitalopram é capaz de diminuir a latência na fuga após uma única sessão de choques inescapáveis, efeito este que não foi observado após o tratamento com desipramina, um antidepressivo tricíclico bastante prescrito na prática clínica (REED et al., 2009). Controversamente, em outro estudo, o tratamento repetido por 6 dias com fluoxetina foi capaz de induzir efeito somente após múltiplas sessões de teste, enquanto que o tratamento prolongado por 21 dias melhorou o déficit em fugir ou escapar após apenas uma sessão de choques inescapáveis (VALENTINE et al., 2008). Esses resultados apontam para a complexidade do desamparo aprendido somada à complexidade do tratamento farmacológico. De maneira semelhante aos animais estressados e tratados com veículo/salina, os animais estressados tratados repetidamente com fluoxetina apresentaram pronunciada heterogeneidade de comportamentos quando submetidos ao desamparo aprendido e foram classificados em “responsivos” ou “não responsivos” de acordo com o número de falhas (figura 24). A depressão resistente ao tratamento (TRD, do inglês *Treatment-Resistance Depression*) é bastante documentada na prática clínica e também bastante controversa em relação à quantidade de tentativas falhas de tratamento, inclusive sendo observada na fase depressiva do transtorno bipolar (GAYNES et al., 2020). Há autores que definem como resistentes ao tratamento, pacientes que passaram por 3 classes diferentes de antidepressivos (BERLIM; TURECKI, 2007; SILVERSTEIN et al.,

2015) há autores que defendem o diagnóstico de TRD após 2 tentativas falhas (PAPADIMITROPOULOU et al., 2017; STRAWBRIDGE et al., 2019), além de autores que incluem tentativas com a eletroconvulsoterapia (ECT) (FEKADU et al., 2009; RUHÉ et al., 2012). Assim, no presente trabalho, por não termos testado mais de um fármaco no mesmo animal, optamos por classificá-los como “não responsivos” à fluoxetina ao invés de resistentes ao tratamento.

A heterogeneidade de respostas ao tratamento com fluoxetina pode estar relacionada à farmacogenética destes animais. Farmacogenética é o campo que estuda como os genes afetam a resposta a um medicamento. Nesse contexto, os genes CYP2D6 e CYP2C19, dois genes da família citocromo P450 (CYP) são bastante conhecidos por influenciarem o metabolismo e a eficácia dos ISRS (HICKS et al., 2015). Altamente polimórficos, ambos os genes modulam a resposta aos antidepressivos através da alteração da funcionalidade das enzimas que codificam, responsáveis pela metabolização de fármacos. Os polimorfismos podem resultar em 4 tipos de metabolizadores: 1. Metabolizadores ultrarrápidos: apresentam atividade enzimática aumentada e, portanto, doses comumente utilizadas podem não ser suficientes para exercer efeitos antidepressivos; 2. Metabolizadores extensivos: atividade enzimática se apresenta como esperada e a resposta terapêutica se dá nas doses normais; 3. Metabolizadores intermediários: apresentam atividade enzimática um pouco lenta, sendo as doses normais de antidepressivos consideradas levemente altas; 4. Metabolizadores lentos: atividade enzimática muito lenta, levando a reações adversas graves em doses comuns (GAEDIGK et al., 2008; SIM; INGELMAN-SUNDBERG, 2010; STINGL; BROCKMÖLLER; VIVIANI, 2013). Os animais utilizados no presente estudo são de linhagem heterogênea, o que resulta em uma grande variabilidade genética. Considerando a complexidade do protocolo de desamparo aprendido e a necessidade de um grande número amostral para observação de efeito estatístico, os experimentos do presente certamente estudo utilizou animais de ninhadas com backgrounds diferentes ao longo dos dois meses em que foi realizado, o que poderia explicar a heterogeneidade de respostas ao tratamento. De crescente uso popular em humanos, os testes genéticos podem direcionar melhor o tratamento em relação à dose e à classe do antidepressivo escolhido (VAN SCHAİK et al., 2020) e, em um cenário ideal de pesquisa,

estes testes poderiam ser aplicados aos animais antes ou depois dos experimentos, a fim de verificar e/ou confirmar o perfil de resposta ao tratamento farmacológico, fazendo com que pesquisadores se beneficiassem da heterogeneidade de respostas em modelos de comportamento animal. Adicionalmente, essa estratégia elevaria o princípio dos 3Rs (redução, substituição, refinamento) da ética em pesquisa animal a outro patamar. Ao não haver descarte de animais em decorrência de resultados aparentemente negativos e/ou inconclusivos, pelo uso de testes genéticos antes ou depois do tratamento, a redução e o refinamento se fariam presentes de maneira genuína.

A expressão diminuída de receptores P2X7 no HPCv, em decorrência do tratamento com antidepressivos, foi demonstrada anteriormente em nosso grupo (RIBEIRO et al., 2019). No presente trabalho, também observamos uma diminuição da expressão gênica de P2X7 dos animais responsivos à fluoxetina, porém no HPCd (figura 30). Adicionalmente, nestes mesmos animais, a expressão gênica de NLRP3 também se apresentou diminuída no HPCd (figura 31). A divisão do hipocampo em ventral e dorsal não se dá apenas em nível anatômico: a expressão gênica, as projeções e conexões dão suporte essa segmentação. Enquanto o hipocampo ventral está mais relacionado ao estresse e emoções, o dorsal desempenha funções cognitivas e de tomada de decisões (FANSELOW; DONG, 2010). Trazendo para nosso contexto, a porção ventral estaria mais envolvida na percepção do estresse e das emoções subjacentes aos choques no desamparo aprendido, enquanto a porção dorsal participaria da percepção do ambiente na sessão T, por exemplo, fazendo a associação do som que precedia os choques. Reconhecidamente importante para o efeito terapêutico dos antidepressivos, o processo de neurogênese já foi demonstrado por estar diminuída em animais que desenvolvem desamparo (HO; WANG, 2010), o que parece estar relacionado à expressão de P2X7, uma vez que animais desamparados apresentam maior ativação das micróglia (IWATA et al., 2016) e menor plasticidade de espinhos dendríticos no hipocampo, sendo ambos acontecimentos conduzidos por receptores P2X7 (MONIF et al., 2009; OTROKOCSI; KITTEL; SPERLÁGH, 2017). Embora não tenha sido possível medir a ativação das micróglia no HPC e os correlatos níveis proteicos do receptor P2X7 no presente trabalho, há dados na literatura demonstrando que ISRS são capazes de modular as

correntes elétricas induzidas por agonistas P2X7 em cultura celular (WANG et al., 2016) e também que animais P2X7 KO respondem melhor ao tratamento com fluoxetina (BASSO et al., 2009). De maneira semelhante, a supressão da cascata neuroinflamatória, com específica diminuição de NLRP3, após tratamento repetido com fluoxetina também já foi demonstrado em animais submetidos ao modelo de privação de sono (XIA et al., 2017), aparentemente através da indução de autofagia (LI et al., 2017) ou da diminuição de espécies reativas de oxigênio e inibição da associação de quinase ao NLRP3 (DU et al., 2016). Assim, nossos resultados acerca da diminuição da expressão gênica de P2X7 e NLRP3 no HPCd dos animais responsivos à fluoxetina, pode ser interpretada como um mecanismo participante do efeito terapêutico da droga. A ativação da via P2X7-NLRP3, tem como consequência o aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , capaz de interferir na sinalização mediada por BDNF, através da inibição da expressão gênica e a tradução proteica dos fatores neurotróficos (TONG et al., 2008), além de diminuir a expressão dos receptores TRKB (SONG; ZHANG; DONG, 2013). A via de sinalização mediada por BDNF foi recentemente implicada no mecanismo de ação dos antidepressivos, de maneira direta, através da ligação dos fármacos ao receptor TRKB, que permite maior liberação de BDNF, fortalecendo os processos de neurogênese e sobrevivência celular, importantes para o efeito dos antidepressivos (CASAROTTO et al., 2021). Dessa maneira, a inibição da via P2X7-NLRP3 com consequente diminuição da liberação de IL-1 $\beta$  e a menor interferência da citocina na via do BDNF, pode ser um dos mecanismos responsáveis pela ação antidepressiva da fluoxetina observada no presente trabalho.

#### **4. Estudo 2: Avaliação do efeito do tratamento repetido com BBG ou com MCC950, e avaliação da associação destes compostos com fluoxetina, em animais da linhagem Wistar Hannover submetidos ao modelo de desamparo aprendido:**

**4.1. Objetivos:** Este estudo objetivou avaliar, em três experimentos independentes, se o tratamento repetido com BBG ou com MCC950 seria capaz de reduzir o número de falhas dos animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido. Em um segundo momento, o estudo pretendeu avaliar se a associação do antagonista purinérgico BBG ou do inibidor do inflamassoma MCC950 com o ISRS, fluoxetina, seria capaz de promover efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos ao desamparo aprendido.

#### **4.2. Material e Métodos**

##### **4.2.1. Animais**

Foram utilizados ratos machos da linhagem Hannover com idade aproximada entre 7 e 8 semanas (250 – 350g), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. As condições de alojamento e de biotério foram as mesmas que as descritas na seção 3.1 do estudo 1.

##### **4.2.2. Drogas**

Para a caracterização do efeito do tratamento com antagonista P2X7 utilizamos o Brilliant Blue G (BBG - Sigma Aldrich, #B0770) nas doses de 25, 50 e 100mg/kg diluídas em salina isotônica estéril. Estas doses foram baseadas em estudos prévios realizados em nosso laboratório (RIBEIRO, 2017). Para as doses de 25 e 50mg foi mantida a proporção de mg/ml para a diluição. Para a dose de 100 mg utilizamos a proporção de mg/5ml e o cálculo de quantidade de droga diluída foi feita individualmente para cada animal, de acordo com o seu peso, antes da administração. Para a caracterização do efeito do tratamento com inibidor do inflamassoma, utilizamos o composto MCC950 nas doses de 10, 20 e 30mg/kg, diluídas em salina isotônica estéril (HUANG et al., 2019; LUO et al., 2019). Para fins de

comparação, foi utilizada a Fluoxetina diluída em salina isotônica estéril + 10% de tween80, administrado na dose de 10 mg/kg/mL/dia. As soluções foram preparadas sempre imediatamente antes do uso e administradas intraperitonealmente.

### 4.3. Procedimentos

#### 4.3.1. Teste de Desamparo Aprendido e Tratamentos Farmacológicos

Para a realização dos testes comportamentais, foi utilizado o mesmo equipamento descrito no Estudo 1, sendo o protocolo também semelhante (dia 1: sessão PT – 0,8mA; dia 07: sessão T – 0,6mA). Os animais do experimento com BBG foram distribuídos entre os grupos Veículo (salina), Fluoxetina, BBG25, BBG50 e BBG100, enquanto os animais do experimento com MCC950 foram divididos entre os grupos Veículo (salina), Fluoxetina 10mg, MCC950 10mg, MCC950 20mg, MCC950 30mg. Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes a administração, que ocorreu no dia 1 imediatamente após a saída da sessão PT, nos dias 2 a 6 no intervalo entre 12h-14h e no dia 7, uma hora antes da sessão T. Para o experimento de associação de drogas, os animais foram divididos em não estressados – salina, estressados – salina, estressado – fluoxetina 10mg, estressados – FLX + BBG 25 mg, estressados – FLX + MCC950 20mg e o esquema de tratamento se deu conforme a figura abaixo:

NST VEIC	ST VEIC	ST FLX10mg	ST FLX+BBG	ST FLX+MCC 950
 Salina + Salina	 Salina + Salina	 Salina + FLX10	 FLX10 + BBG 25mg	 FLX10 + MCC950 20mg

**Figura 38: Esquema de administração combinada de fluoxetina e drogas de interesse.** BBG= brilliant blue G (antagonista P2X7); FLX= fluoxetina (antidepressivo ISRS); MCC950 = inibidor NLRP3; NST= animais não estressados; ST = animais estressados; VEIC = veículo.

Imediatamente após a sessão PT, todos os animais foram mantidos isolados, com livre acesso à comida e água até o momento da sessão T. Os experimentos foram repetidos em dias diferentes, com todos os grupos de tratamento igualmente distribuídos durante os dias, até que se completasse o número de animais necessário para a análise. Além disso, por se tratar de um experimento longo (de 6 a 8 horas de duração, aproximadamente), os grupos de tratamento foram randomizados ao longo do dia para evitar possíveis influências circadianas.

#### **4.4. Análise Estatística**

Para os dados comportamentais do desamparo nos experimentos com administração isoladas de BBG ou MCC950, foram analisados o número de falhas, de esquivas, de fugas, e de cruzamentos através do método de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para o experimento em que as drogas foram administradas em esquema adjunto, a análise do número de falhas, de esquivas, de fugas e de cruzamentos foi realizada através do método de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn e a análise da latência para fuga ou esquiva do choque foi analisada através da ANOVA de uma via.

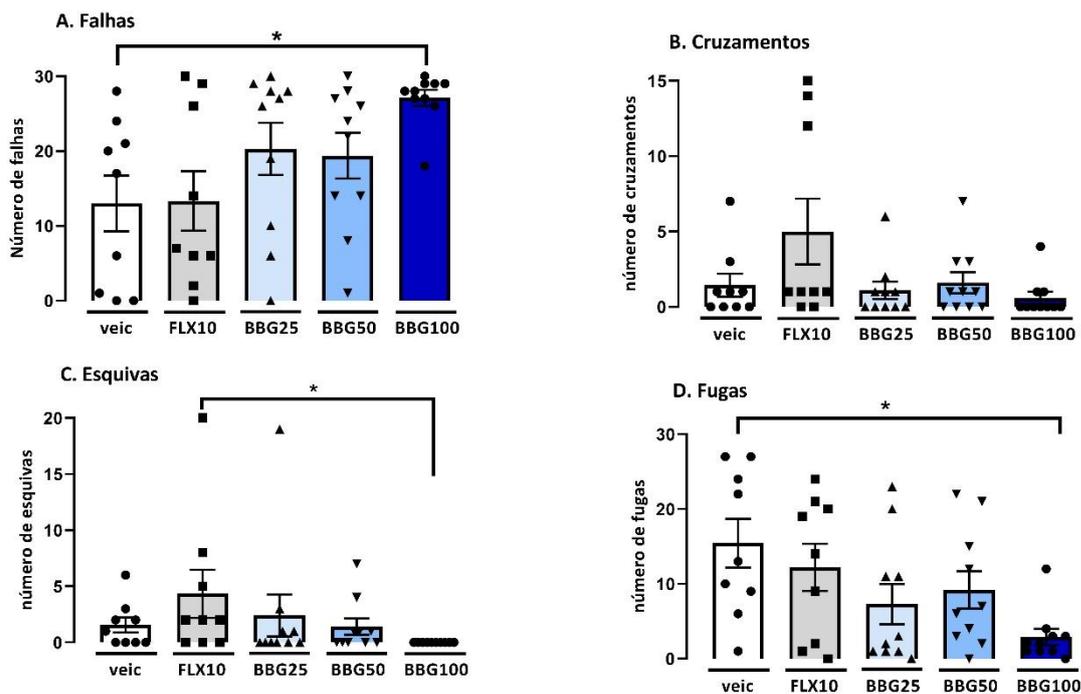
A análise de peso corporal foi realizada através da ANOVA de duas vias, sendo considerados os fatores dias de tratamento (1 a 7) e grupo de tratamento. Quando houve diferença significativa em um dos fatores, os grupos foram analisados separadamente de acordo com os dias de tratamento, através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tuckey.

#### **4.5. Resultados**

##### **4.5.1. Efeito do tratamento com BBG no número de falhas, fugas, esquivas e cruzamentos em animais submetidos ao desamparo aprendido.**

A análise de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn indicou que os animais tratados com BBG 100mg apresentaram número de falhas maior do que os animais tratados com veículo ( $H(5)=11,29$ ;  $p=0,0235$ ; Fig 39A). De maneira complementar, o número de fugas dos animais tratados com BBG 100mg foi menor que a dos animais tratados com veículo ( $H(5)=10,09$ ;  $p=0,0390$ ; Fig 39D). Para o

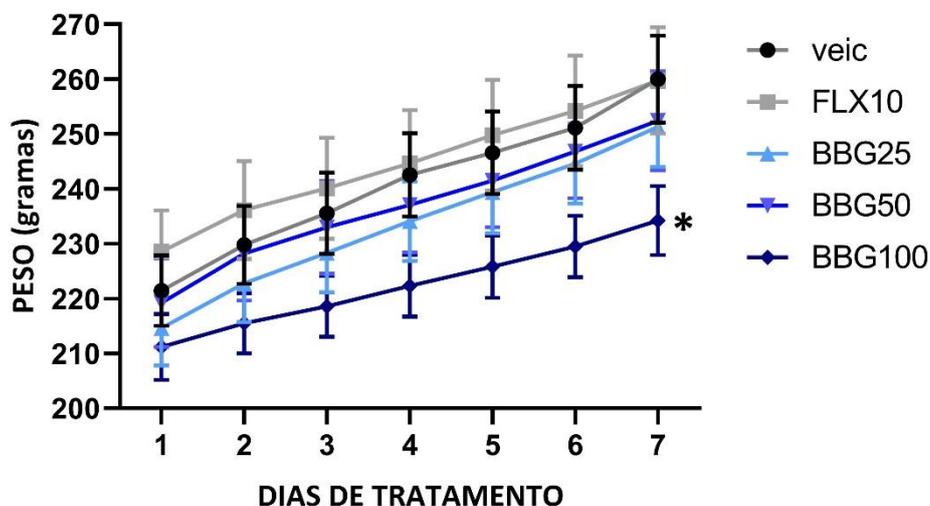
número de esquivas, a análise indicou que os animais tratados com BBG 100mg apresentaram menos esquivas do que os animais tratados com FLX 10 mg ( $H(5)=10,59$ ;  $p= 0,0316$ ; Fig 39C). Não houve diferença significativa no número de cruzamentos dos animais ( $H= 5,200$ ;  $p= 0,2674$ ; Fig 39B).



**Figura 39: Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou BBG 25, 50 ou 100mg sobre o número de falhas (A), cruzamentos (B), esquivas (C) e fugas (D) em animais submetidos ao desamparo aprendido. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n= 09 - 10$ ; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. O asterisco indica diferença significativa entre os grupos BBG100 e VEIC ou BBG100 e FLX10 ( $*p<0,05$ ).**

#### 4.5.2. Efeito do tratamento com antagonista P2X7 peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido.

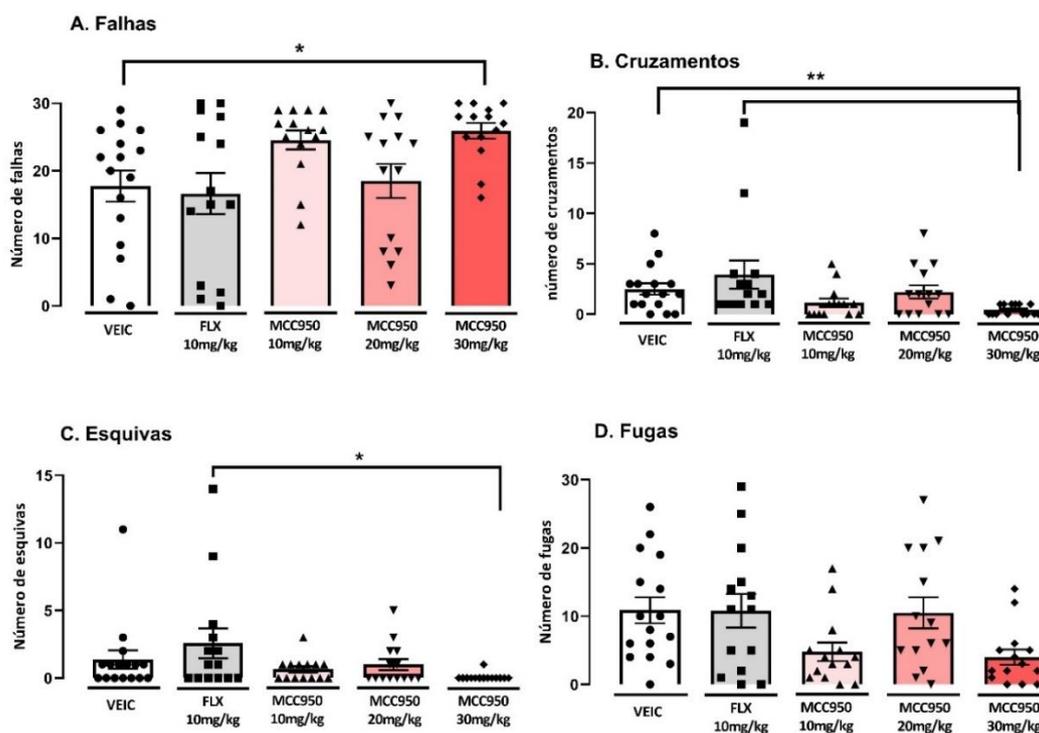
A ANOVA de duas vias seguida do teste de Tuckey indicou haver interação entre os fatores tratamento e dia de tratamento ( $F_{(24, 402)} = 4,120$ ;  $p < 0,0001$ ), sendo o peso corporal dos animais tratados com BBG 100mg menor quando comparados com os animais tratados com veículo ( $p < 0,0001$ ), ou fluoxetina 10mg ( $p < 0,0001$ ), ou BBG 25mg ( $p = 0,0277$ ), ou BBG 50mg ( $p = 0,0045$ ).



**Figura 40: Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou BBG 25, 50 ou 100mg sobre peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido.** Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n = 09 - 10$ ; ANOVA de duas vias seguida do teste de Tuckey. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo BBG100 e o os grupos VEIC, FLX10, BBG25 ou BBG50 (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.5.3. Efeito do tratamento com MCC950 no número de falhas, fugas, esquivas e cruzamentos em animais submetidos ao desamparo aprendido.

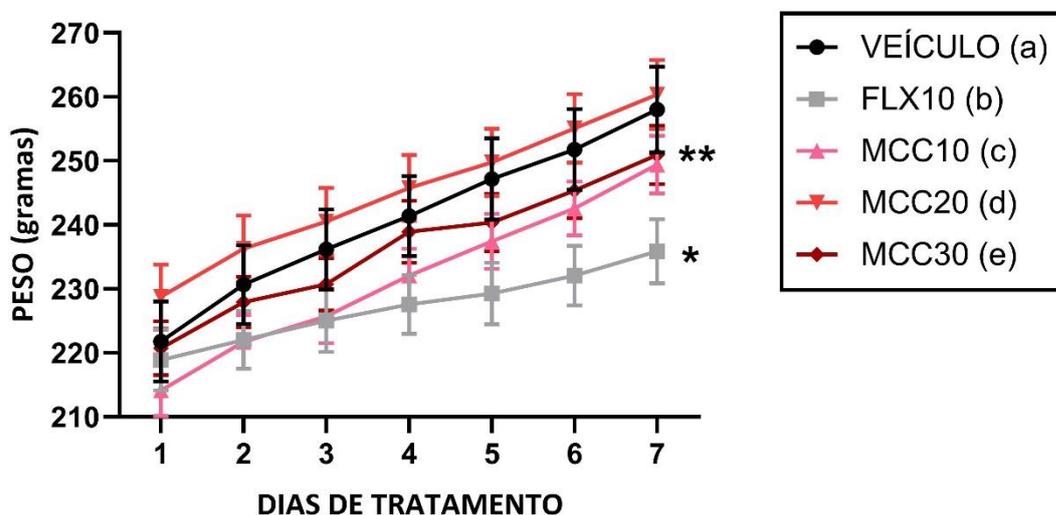
A análise por Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, mostrou que não houve efeito significativo do tratamento repetido com fluoxetina ( $H=12,70$   $p=0,0128$ ) ou com MCC950 nas doses de 10mg/kg ( $H=12,70$   $p=0,0128$ ) e 20mg/kg ( $H=12,70$ ;  $p>0,9999$ ) sobre o número de falhas, conforme figura 41. A análise indicou efeito significativo na dose de 30mg/kg em aumentar o número de falhas ( $H=12,70$ ;  $p=0,0128$ ; figura 41A) e diminuir o número de esquivas ( $H=10,45$ ;  $p=0,0335$ ; figura 41C), quando comparada com o grupo controle (figura 41A e 41C, respectivamente). A análise mostrou haver redução no número de cruzamentos dos animais tratados com 30mg de MCC950 em relação aos animais tratados com salina ( $H=17,36$ ;  $p=0,0016$ ) e em relação aos animais tratados com FLX (figura 41B) ( $H=17,36$ ;  $p=0,0016$ ). Não houve diferença significativa no número de fugas ( $H=12,43$ ;  $p=0,0144$ ; figura 41D).



**Figura 41:** Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou MCC950 10mg, MCC950 20mg ou MCC950 30mg sobre o número de falhas, de cruzamentos, de fugas e esquivas dos animais submetidos ao desamparo aprendido. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n=14-16$ ; Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo MCC950 30mg e o os grupos VEIC e FLX10mg (\* $p<0,05$ ).

#### 4.5.4. Efeito do tratamento com MCC950 sobre o peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido.

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste de Tuckey indicou haver interação entre os fatores tratamento e dia de tratamento ( $F_{(24, 258)} = 7,566$ ;  $p < 0,0001$ ). Os animais tratados com FLX apresentaram peso menor quando comparados com o grupo veículo ( $F_{(24, 258)} = 7,566$ ;  $p = 0,0002$ ), com o grupo MCC950 20mg ( $F_{(24, 258)} = 7,566$ ;  $p < 0,0001$ ) e com o grupo MCC950 30mg ( $F_{(24, 258)} = 7,566$ ;  $p = 0,0052$ ). Os animais tratados com MCC950 30mg também apresentaram peso corporal menor quando comparados com os animais tratados com MCC950 20mg ( $F_{(24, 258)} = 7,566$ ;  $p < 0,0001$ ).

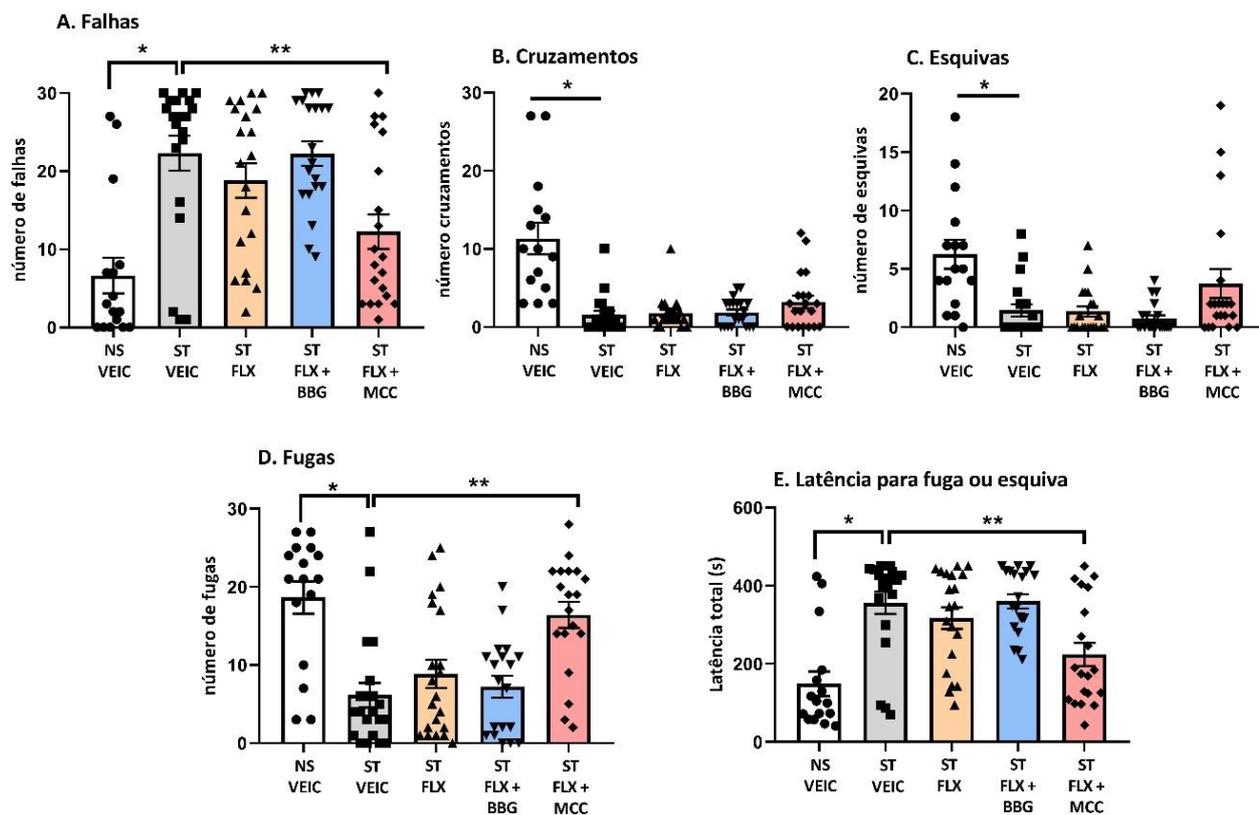


**Figura 42:** Efeito do tratamento repetido com fluoxetina 10mg ou MCC950 10mg, MCC950 20mg ou MCC950 30mg sobre peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n = 14 - 16$ ; ANOVA de duas vias seguida do teste de Tuckey. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre os grupos FLX e Veic, FLX e MCC950 20mg e FLX e MCC950 30mg, enquanto o asterisco duplo (\*\*) representa diferença significativa entre MCC950 30mg e MCC950 20mg (\* $p < 0,05$ ).

#### **4.5.5. Efeito do tratamento combinado de fluoxetina e BGG ou fluoxetina e MCC950 sobre o número de falhas, fugas, esquivas, cruzamentos e latência total em animais submetidos ao desamparo aprendido**

A análise por Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, mostrou que o número de falhas dos animais não estressados foi menor do que o número de falhas dos animais estressados e tratados com salina ( $H=28,26$ ;  $p<0,0001$ ; Figura 43A). De maneira semelhante, o número de falhas dos animais estressados tratados com FLX+MCC950 foi menor do que o número de falhas dos animais estressados tratados com salina ( $H=28,26$ ;  $p=0,0218$ ; Figura 43A), como demonstrado na figura 43A. O número de cruzamentos ( $H=31,16$ ;  $p<0,0001$ ; figura 43B), esquivas ( $H=25,04$ ;  $p= 0,0005$ ; figura 43C) e fugas ( $H=28,84$ ;  $p=0,0002$ ; figura 43D) dos animais estressados e tratados com veículo foi menor quando comparado com animais não estressados e tratados com veículo. O número de fugas dos animais estressados e tratados com FLX+MCC950 também foi menor quando comparado com os animais estressados e tratados com veículo ( $H=28,84$ ;  $p=0,0012$ ; figura 43D).

A análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett demonstrou que os animais não estressados e tratados com veículo apresentam menor latência em fugir ou escapar dos choques quando comparados com animais estressados e tratados com veículo ( $F_{(4, 91)}=10,57$ ;  $p<0,0001$ ; figura 43E). De maneira semelhante, os animais estressados e tratados com FLX + MCC950 também apresentam menor latência em fugir ou escapar do choque quando comparados com os animais estressados e tratados com veículo ( $F_{(4, 91)}=10,57$ ;  $p=0,0028$ ; figura 43E).



**Figura 43: Efeito do tratamento combinado de fluoxetina e BGG ou fluoxetina e MCC950 sobre o número de falhas, cruzamentos, esquivas, fugas e latência total.** BBG= *Brilliant Blue G*; FLX= fluoxetina (antidepressivo ISRS); NST= animais não estressados; ST = animais estressados; VEIC = veículo. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n= 16 - 20$ ; Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn e ANOVA de uma via seguida de Dunnett (latência). O asterisco (\*) indica diferença significativa entre o grupo NST VEIC e ST VEIC, enquanto que o asterisco duplo (\*\*) indica diferença significativa entre os grupos ST FLX+MCC950 e o ST VEIC (\* $p<0,05$ ).

#### 4.6. Discussão – Estudo 2

Neste estudo, buscamos avaliar se o tratamento repetido com BBG, antagonista P2X7, seria capaz de induzir efeito antidepressivo nos animais submetidos ao desamparo aprendido. De maneira semelhante ao observado no Estudo 1, os animais apresentaram pronunciada heterogeneidade em todos os grupos (figura 39). O tratamento repetido com 100mg de BBG induziu aumento no número de falhas nos animais (figura 39 A) além de diminuição no número de fugas (figura 39 D) em relação aos animais tratados com veículo/salina e também no menor ganho de peso corporal em relação a todos os outros grupos (figura 40). Adicionalmente, estes mesmos animais tratados com 100mg de BBG apresentaram número de esquiva menor em relação ao grupo tratado com fluoxetina (figura 39 C). O aumento do número de falhas poderia ser atribuído ao efeito do BBG sobre a atividade locomotora dos animais, porém não houve diferença no número de cruzamentos em nenhum dos grupos estudados (figura 39 B).

Esses resultados são contrários a outros achados em que animais submetidos a estresse crônico variável apresentaram comportamento tipo-antidepressivo no teste do nado forçado após tratamento com BBG (50mg), juntamente com aumento na preferência por sacarose (ARICIOGLU et al., 2019). Além disso, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o tratamento repetido com BBG na dose de 50mg (7 dias) foi capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo nos animais submetidos ao desamparo (RIBEIRO et al., 2019a). Este estudo, no entanto, foi realizado com a antiga linhagem de ratos disponibilizada pelo biotério central, o que pode ser uma das principais causas nas diferenças de resultados observadas no presente trabalho, como discutido anteriormente (estudo 1). Além disso, também foi demonstrado pelo nosso grupo que o efeito tipo-antidepressivo do antagonismo de receptores P2X é dependente de uma neurotransmissão monoaminérgica intacta (DINIZ, 2016), o que não temos dados sobre a nova linhagem Wistar Hannover.

Os receptores P2X7 são canais iônicos regulados por ligantes e ativados por ATP extracelular e apresentam características que os tornam singulares e distintos dentre a família de receptores P2X.

Estruturalmente, apresentam uma cauda N-terminal curta, 2 domínios transmembrânicos ligados por uma alça extracelular e uma cauda C-terminal característica, constituída por 200 resíduos de aminoácidos a mais em relação aos outros P2X, que está envolvida em processos como ativação de vias de sinalização, localização celular, interações entre proteínas e até mesmo modificações pós-tradução (COSTA-JUNIOR; VIEIRA; COUTINHO-SILVA, 2011)Clique aqui para inserir texto.. Farmacologicamente, os receptores P2X7 requer uma concentração de ATP considerada elevada quando comparado com outros receptores P2X, com  $EC_{50} \geq 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (BIANCHI et al., 1999) e antagonistas como BBG e A-804598 apresentam bons resultados em modelos preditivos de antidepressivos como o teste de suspensão pela cauda e o teste de nado forçado (BASSO et al., 2009; CSÖLLE et al., 2013; IWATA et al., 2016). As doses utilizadas no presente trabalho estão de acordo com os dados na literatura, no entanto, nenhuma foi capaz de prevenir o déficit comportamental decorrente da exposição aos choques inescapáveis da sessão PT. Uma das possibilidades para o BBG ter induzido um aumento no número de falhas, seria a indução de um estado tipo-ansio gênico nos animais. Resultados semelhantes foram demonstrados com o composto FG-7142, um antagonista benzodiazepínico, em que animais tratados com o composto apresentaram uma maior latência para o cruzamento durante a liberação dos choques, 24h após a sessão pré-teste, indicando um efeito tipo-ansio gênico da droga (DRUGAN et al., 1985). No entanto, estudos apontam que o tratamento com BBG é capaz de produzir efeito tipo-ansiolítico em camundongos recém-nascidos tratados com LPS (SILVA et al., 2019) e em ratos submetidos a modelo farmacológico de epilepsia (HONG et al., 2020). Em ambos os estudos, os efeitos tipo-ansiolítico do BBG é atribuído ao antagonismo dos receptores P2X7 localizados em micróglia, exercendo o BBG um efeito neuroprotetor. No presente estudo, embora não houve diferença estatística significativa no número de cruzamentos, é possível notar que os animais tratados com a dose de 100mg não apresentaram nenhuma atividade locomotora durante os 30 ciclos da sessão teste (figura 39 B), nos permitindo considerar que essa dose é capaz de induzir efeito locomotor nos animais e que a escolha de menores doses talvez fosse interessante em estudos posteriores.

Em um único trabalho relacionando diretamente o tratamento com BBG com o peso corporal dos animais, foi reportado que o tratamento repetido foi capaz de prevenir a perda de peso em um modelo genético de camundongos com esclerose lateral amiotrófica, sendo este efeito observado apenas em fêmeas (BARTLETT et al., 2017). Uma das lacunas em trabalhos com comportamento animal é o acompanhamento e reporte do peso corporal dos animais, especialmente quando o tratamento é repetido ou crônico. Uma vez que alterações de peso é um dos sintomas acessórios para diagnóstico da depressão e que antidepressivos também são capazes de modular essa característica fisiológica, seria coerente que o peso dos animais tivesse um acompanhamento, sendo reportado na literatura. A proposta por uma visão mais holística e menos reducionista vem sendo cada vez mais defendida e difundida (FANG; CASADEVALL, 2011), podendo ser o recurso interessante na análise de resultados denominados negativos à primeira vista.

O composto MCC950, também conhecido como CP-456,773 ou CRID3, é descrito como uma molécula pequena, potente e específica para inibição do inflamassoma NLRP3 (COLL et al., 2015a). A montagem e ativação do inflamassoma NLRP3 é decorrente do estímulo de duas vias de sinalização complementares: a primeira via, induzida por receptores Toll-like, mediante reconhecimento de DAMPs ou PAMPs, estimula o fator de transcrição NF- $\kappa$ B a migrar para o núcleo celular, onde ocorre a transcrição de componentes NLRP3, pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18; em paralelo, a segunda via é também ativada pela presença de DAMPs ou PAMPs e desencadeia a montagem do complexo inflamassoma NLRP3, com o recrutamento da proteína adaptadora ASC e da pró-caspase-1 que, uma vez clivada, estará em sua forma ativa integrando o oligômero completo do inflamassoma NLRP3 (KAUFMANN et al., 2017). Nesse sentido, foi demonstrado que o MCC950 é capaz de interagir diretamente com NLRP3, especificamente no domínio NACTH, tendo como consequência a inibição da hidrólise de ATP e a inibição da ativação do inflamassoma (COLL et al., 2015b). No presente estudo, o tratamento com 3 doses diferentes de MCC950 não foi capaz de diminuir o número de falhas dos submetidos ao desamparo aprendido, tendo produzido o efeito oposto (figura 41 A). Apesar de não termos corroborado nossa hipótese, nossos dados constituem uma novidade científica, visto que não há

nenhum estudo demonstrando o potencial efeito antidepressivo do MCC950 em animais submetidos ao desamparo aprendido. Adicionalmente, os animais tratados com a maior dose (30mg/kg) apresentaram alteração na atividade locomotora (figura 41 B), dado também ainda não reportado na literatura até o presente momento. Um estudo utilizando MCC950 em modelo animal de esclerose múltipla, demonstrou que, após 1h da administração oral do composto, foi observado um efeito analgésico em camundongos (KHAN et al., 2018). A indução de uma analgesia, portanto, não pode ser descartada em nosso estudo, principalmente nos animais tratados com a maior dose (30mg/kg), o que explicaria a reduzida atividade locomotora. Embora os wistar hanover sejam amplamente utilizados em pesquisas toxicológicas, também não há dados do perfil de resposta inflamatória destes animais em decorrência da exposição ao estresse, o que limita a interpretação dos nossos resultados, visto que essa linhagem pode apresentar características fisiológicas e comportamentais bastante peculiares. Outra limitação é ausência da análise molecular que poderia jogar luz aos achados comportamentais. Ao analisarmos a expressão gênica e proteica dos componentes do inflamassoma poderíamos associar os níveis destes com a atividade locomotora, além de poder relacionar a expressão destes mesmos componentes com as subpopulações observadas no grupo tratado com 20mg, por exemplo. De maneira complementar, a análise da ativação das micróglia também poderia trazer respostas interessantes, uma vez que camundongos tratados com MCC950 apresentaram micróglia morfológica menos alterada após a exposição ao estresse (LIU et al., 2020). Desta maneira, a análise da expressão gênica e proteica dos componentes de NLRP3, caspase-1 e IL-1 $\beta$ , bem como da ativação microglial e da expressão de receptores P2X7 dos wistars hanover poderiam trazer um melhor entendimento do efeito do MCC950 em animais submetidos ao desamparo aprendido.

De maneira semelhante ao BBG e ao MCC950, o tratamento repetido com fluoxetina não foi capaz de reduzir o número de falhas dos wistars hanover (figuras 39 e 40), apontando que talvez estes animais apresentem atributos fisiológicos que necessitem de uma investigação mais aprofundada. Como discutido no estudo anterior, características como a farmacogenética podem interferir diretamente na metabolização das drogas, prejudicando o efeito terapêutico de antidepressivos e

outros compostos, o que poderia explicar, em parte, a não responsividade dos wistars hanover a diferentes compostos com ação antidepressiva. Uma possibilidade é que estes animais respondam melhor a menores doses durante um tempo maior de tratamento, uma vez que doses menores causam menos efeitos colaterais (observados aqui como alteração na atividade locomotora e a possível analgesia induzida pelo MCC950, por exemplo), o que pode ser especialmente importante em tratamentos repetidos (DIMMITT; STAMPFER, 2009; MCCORMACK; ALLAN; VIRANI, 2011)

A associação de drogas é uma estratégia utilizada na prática clínica para pacientes diagnosticados como depressão resistente ao tratamento (TRD, do inglês *treatment-resistant depression*) e consiste na adição de um medicamento pertencente à uma classe diferente ou que apresente mecanismo de ação distinto do medicamento atual, de maneira que essas ações melhorem o efeito do tratamento em curso (PHILIP et al., 2010). Neste contexto, utilizamos as doses que apresentaram pronunciada heterogeneidade nos estudos anteriores e associamos ao tratamento com fluoxetina e observamos que o tratamento repetido com FLX (10mg) + MCC950 (30mg) foi capaz de diminuir o número de falhas dos animais (figura 43 A) fugas (figura 43 D) e, conseqüentemente, a latência para fugir ou escapar dos choques (figura 43 E). Apesar da estratégia de associação de antidepressivos com agentes anti-inflamatórios já ser utilizada (ANDRADE, 2014; CITROME; KUMAR JHA, 2019), não há dados sobre associação de fluoxetina com inibidores de inflamassoma NLRP3 na literatura, fazendo de nossos dados uma novidade científica. Os dados utilizando anti-inflamatórios como monoterapia em pacientes diagnosticados com depressão são bastante controversos pois, geralmente, a população alvo é de pacientes com enfermidades cuja dor e inflamação são sintomas diagnósticos e a depressão ocorre como uma comorbidade (HOLMES; CHRISTELIS; ARNOLD, 2013). Nestes pacientes, o uso de anti-inflamatórios não estereoidais (AINEs) parece diminuir os sintomas depressivos, porém isto é apontado como sendo consequência da diminuição da dor e as limitações impostas por elas e não necessariamente um efeito antidepressivo per se, uma vez que pacientes com enfermidades em que não há dor, como, por exemplo o Alzheimer, não apresentaram melhoras nos sintomas depressivos quando tratados com AINEs (FIELDS et al., 2012). Uma grande questão no

tratamento com AINEs é o efeito adverso de sangramento gastrointestinal, que tem o risco aumentado quando combinado com ISRS (ANDRADE, 2012; ANDRADE et al., 2010), além de riscos aumentados de infarto do miocárdio, de maneira dose-dependente (VARAS-LORENZO et al., 2013), evento que também é observado em pacientes diagnosticado com depressão (SHER; LOLAK; MALDONADO, 2010). Dessa maneira, um composto anti-inflamatório com perfil mais seguro se faz interessante para a estratégia de associação com antidepressivos. Novamente, a análise molecular dos animais tratados com FLX+MCC950 constituiria um dado relevante para o entendimento dos mecanismos pelos quais a combinação destes dois compostos leva a um comportamento tipo-antidepressivo. Considerando os resultados moleculares mostrados no estudo 1, em que os animais responsivos ao tratamento com FLX apresentaram diminuição dos níveis de RNAm de NLRP3 no HPDd, uma hipótese a ser considerada aqui é que o efeito tipo-antidepressivo observado nos animais tratados com FLX+MCC950 pode ser resultado da já demonstrada inibição da fluoxetina sobre os componentes da cascata do inflamassoma (DU et al., 2016), e da inibição conjunta do MCC950 e fluoxetina sobre os transportadores de serotonina, ainda sem dados na literatura.

A associação de antidepressivo com antagonista purinérgico já foi descrita na literatura, porém utiliza antagonistas dos receptores de adenosina (KALE et al., 2010; LÓPEZ-CRUZ; SALAMONE; CORREA, 2018; POLESZAK et al., 2019), cuja via de ação é diferente da via dos receptores P2X7, um dos alvos do presente trabalho. O BBG é um antagonista dos receptores P2X7 e P2X4, este último ainda pouco investigado nos transtornos depressivos. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o tratamento com imipramina é capaz de reduzir a expressão de receptores P2X4 no hipocampo de ratos submetidos ao desamparo aprendido (RIBEIRO et al., 2019b). No entanto, além de utilizar uma classe diferente de antidepressivos, a abordagem farmacológica não incluiu a associação de drogas como o presente estudos, limitando as possíveis comparações entre os trabalhos.

## **5. Estudo 3: Efeito do tratamento com cetamina ou com cetamina associada à fluoxetina em animais da linhagem Wistar Hannover submetidos ao modelo de desamparo aprendido**

**5.1. Objetivos:** O objetivo deste estudo foi, em um primeiro momento, analisar se o tratamento repetido e em dias alternados com cetamina seria capaz de reduzir o número de falhas nos animais submetidos ao desamparo aprendido. Posteriormente, o estudo intentou avaliar se a associação da cetamina com a fluoxetina seria capaz de reduzir o número de falhas dos animais, também utilizando o modelo de desamparo aprendido.

### **5.2. Material e Métodos**

#### **5.2.1. Animais**

Foram utilizados ratos machos da linhagem Hannover com idade aproximada entre 7 e 8 semanas (250 – 350g), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. As condições de alojamento e de biotério foram as mesmas que as descritas na seção 3.1 do estudo 1.

#### **5.2.2. Drogas e Tratamento Farmacológico**

Foram utilizadas no seguinte estudo: cloridrato de dextrocetamina (cetamina, Cristália #L18010054) nas doses de 15 e 30mg/kg diluídas em salina isotônica estéril, baseadas em estudos da literatura (ASSIS et al, 2009; JIANG et al, 2017 ) e fluoxetina 10mg/kg/ml, diluída em salina isotônica estéril + 2%Tween 80.

### **5.3. Procedimentos**

#### **5.3.1. Teste de Desamparo Aprendido**

Para a realização do teste comportamental, foi utilizado o mesmo equipamento descrito no Estudo 1, sendo o protocolo também semelhante (dia 1: sessão PT – 0,8mA; dia 07: sessão T – 0,6mA). Os animais foram distribuídos entre os grupos Não Estressado Veículo (salina), Estressado Veículo

(salina), cetamina 15mg e cetamina 30mg, sendo as drogas administradas de acordo com o esquema demonstrado na figura 48. O protocolo para animais Não estressados e Estressados foi realizado conforme descrito no item 3.3.1.

Imediatamente após a sessão PT todos os animais foram mantidos isolados, com livre acesso à comida e água até o momento da sessão T. Os experimentos foram repetidos em dias diferentes, com todos os grupos de tratamento igualmente distribuídos durante os dias, até que se completasse o número de animais necessário para a análise. Além disso, por se tratar de um experimento longo (de 6 a 8 horas de duração, aproximadamente), os grupos de tratamento foram randomizados ao longo do dia para evitar possíveis influências circadianas.

### **5.3.2. Tratamento Farmacológico**

As doses de 15 e 30mg/kg foram administradas em grupos independentes e em esquema repetido e intercalado, 24h (dia 2), 72h (dia 4) e 120h (dia 6) após a sessão PT, conforme esquema mostrado na figura 44. A cetamina é um antagonista NMDA, com efeitos conhecidos sobre memória e aprendizagem, além de efeitos psicoestimulantes, portanto, esse esquema de tratamento foi escolhido para evitar tanto a consolidação de memória aversiva quando administrada imediatamente após o PT, quanto possíveis efeitos sobre a locomoção, se administrada logo antes da sessão T. As soluções foram preparadas sempre imediatamente antes do uso e administradas intraperitonealmente.

1 (PT)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)	6 (120h)	7 (T)
Salina	KET 	Salina	KET 	Salina	KET 	Salina

**Figura 44: Esquema de administração intervalado da cetamina.** As doses de 15 e 30mg foram administradas em grupos independentes nos dias 2, 4 e 6 (24h, 72h e 120h após a sessão PT, respectivamente). PT = sessão pré-teste; KET = cetamina; T= sessão teste.

No segundo experimento, de maneira semelhante ao experimento 1, os animais foram tratados uma vez ao dia, por 7 dias, sendo a primeira administração imediatamente após a sessão PT e a última 1 hora antes da sessão T. Dos dias 2 ao 6 as administrações foram realizadas no intervalo entre 11-13h. As administrações de cetamina foram feitas de maneira intercalada, 24h (dia 2), 72h (dia 4) e 120h (dia 6) após a sessão PT, conforme esquema mostrado na figura 45. As soluções foram preparadas sempre imediatamente antes do uso e administradas intraperitonealmente.

	1 (PT)	2 (24h)	3 (48h)	4 (72h)	5 (96h)	6 (120h)	7 (T)
NST VEIC	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina
ST VEIC	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina	Salina + Salina
ST <i>FLX 10mg</i>	Salina + <i>FLX</i>	Salina + <i>FLX</i>	Salina + <i>FLX</i>	Salina + <i>FLX</i>	Salina + <i>FLX</i>	Salina + <i>FLX</i>	Salina + <i>FLX</i>
ST <b>KET 30mg</b>	Salina + Salina	Salina + <b>KET</b>	Salina + Salina	Salina + <b>KET</b>	Salina + Salina	Salina + <b>KET</b>	Salina + Salina
ST <b>FLX+KTM</b>	<i>FLX</i> + Salina	<b>FLX</b> + <b>KET</b>	<i>FLX</i> + Salina	<b>FLX</b> + <b>KET</b>	<i>FLX</i> + Salina	<b>FLX</b> + <b>KET</b>	<i>FLX</i> + Salina

**Figura 45: Esquema de administração combinada de fluoxetina e ketamina.** FLX= fluoxetina (antidepressivo ISRS); KET = cetamina; NST= animais não estressados; PT = sessão pré-teste; ST = animais estressados; T= sessão teste; VEIC = veículo; 24h, 48h, 72h, 96 e 120h indicam o tempo decorrido após a sessão PT.

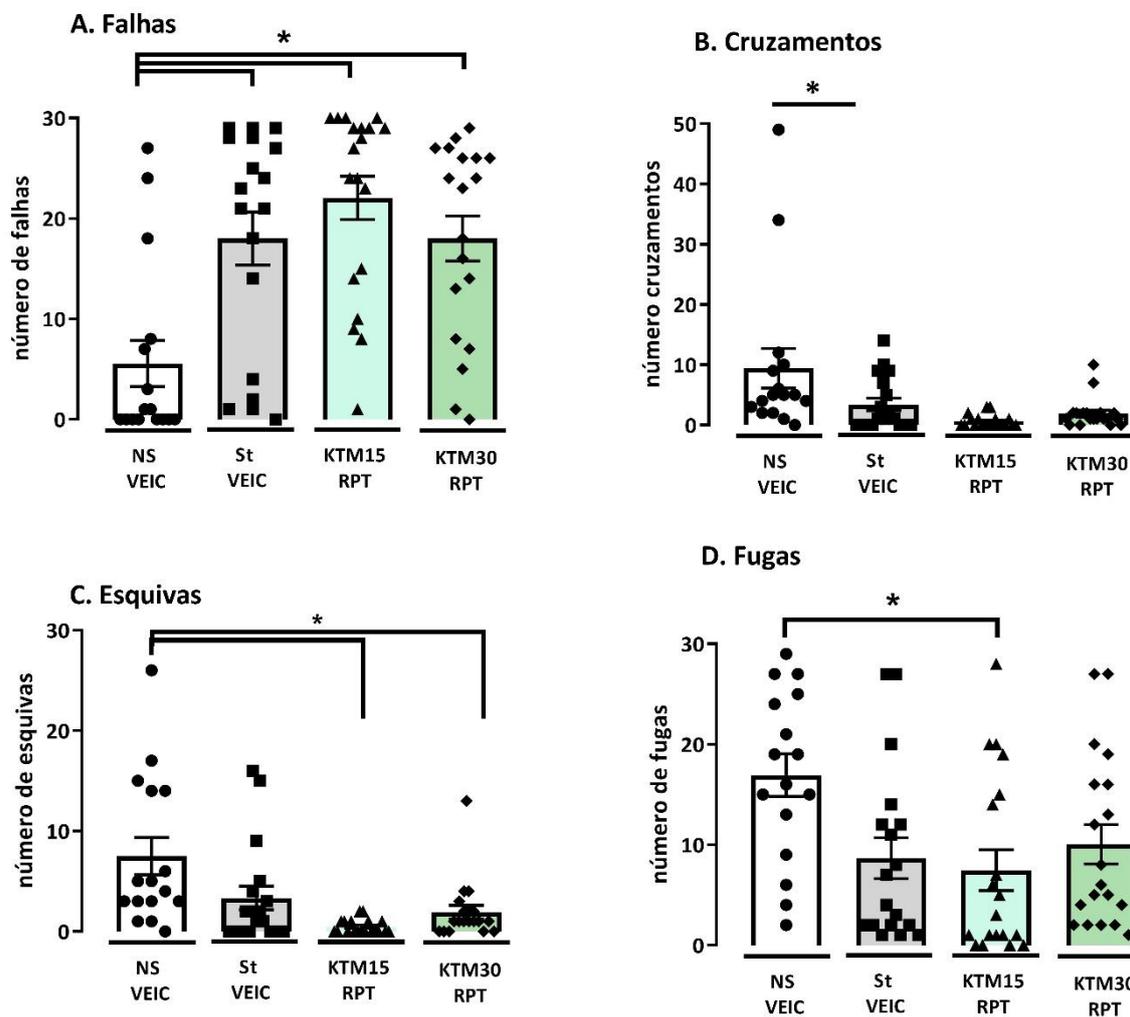
#### 5.4. Análise Estatística

Para os dados comportamentais do desamparo, foram analisados o número de falhas, de esquivas, de fugas, e de cruzamentos através do método de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. A análise de peso corporal foi realizada através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas, sendo considerados os fatores dias de tratamento (dias 2, 4 e 6 – dias de tratamento com cetamina) e grupo de tratamento. Quando houve diferença significativa em um dos fatores, os grupos foram analisados separadamente de acordo com os dias de tratamento ou com o tratamento recebido, através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tuckey.

#### 5.5. Resultados

##### 5.5.1. Efeito do tratamento com cloridrato de cetamina no número de falhas, fugas, esquivas e cruzamentos em animais submetidos ao desamparo aprendido.

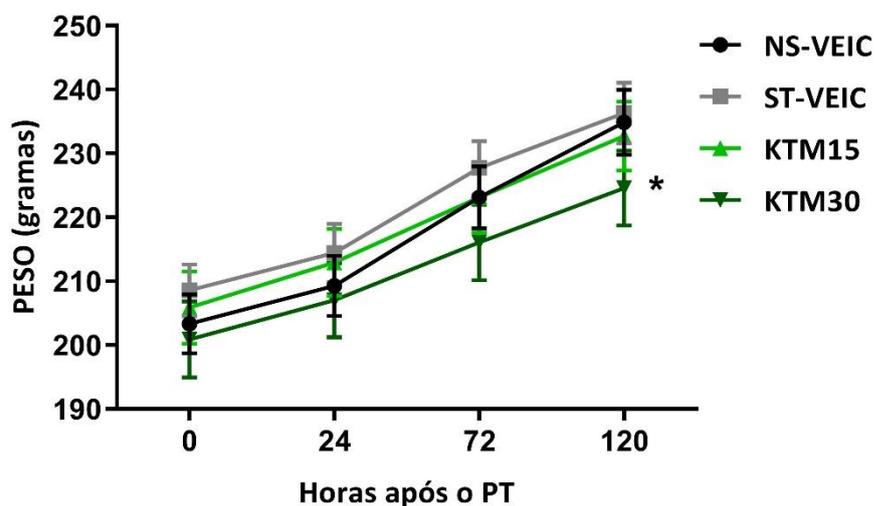
A análise por Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, mostrou que o número de falhas dos animais não estressados foi menor do que o número de falhas dos animais estressados e tratados com salina ( $H=21,72$ ;  $p=0,0105$ ) ou com cetamina nas doses de 15mg/kg ( $H=12,70$ ;  $p<0,0001$ ) e 30mg/kg ( $H=12,70$ ;  $p=0,0167$ ), como demonstrado na figura 46A. A mesma análise também indicou efeito significativo do estresse sobre a atividade locomotora dos animais, uma vez que animais não estressados apresentaram maior número de cruzamentos do que animais estressados tratados com salina ( $H=21,39$ ;  $p=0,0380$ ; figura 46B) dose de 30mg/kg em aumentar o número de falhas ( $H=12,70$ ;  $p=0,0128$ ) e diminuir o número de esquivas ( $H=10,45$ ;  $p=0,0335$ ), quando comparada com o grupo controle (figura 46A e 46C, respectivamente). O número de esquivas dos animais tratados com cetamina 15mg ( $H=22,95$ ;  $p<0,0001$ ) ou cetamina 30mg ( $H=22,95$ ;  $p=0,0268$ ) foi menor do que o número de esquivas dos animais não estressados tratados com salina (figura 46C) e o número de falhas dos animais tratados com cetamina 15mg foi menor do que o número de esquivas dos animais não estressados tratados com veículo ( $H=12,22$ ;  $p=0,0045$ ), segundo análise de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn (figura 46D).



**Figura 46: Efeito do estresse ou do tratamento repetido com cetamina 15mg ou 30mg sobre o número de falhas, de cruzamentos, de fugas e esquivas dos animais submetidos ao desamparo aprendido.** Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n = 16 - 19$ ; Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo Não Estressado Veículo e os grupos Estressado Veículo, cetamina 15mg ou cetamina 30mg ( $*p < 0,05$ ).

### 5.5.2. Efeito do tratamento com cloridrato de dextrocetamina sobre o peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido.

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou haver efeito dos fatores Tratamento ( $F_{(3, 200)}=2,992$ ;  $p= 0,0320$ ), e Dia de tratamento ( $F_{(3, 72)} = 14,69$ ;  $p<0,0001$ ) sobre o peso corporal dos animais, porém sem interação entre os fatores ( $F_{(9, 200)} = 0,1190$ ;  $p= 0,9992$ ). O pós-teste de Tuckey indicou que os animais tratados com cetamina 30mg apresentaram menor peso corporal em relação aos animais estressados tratados com veículo ( $F_{(3, 200)}= 9,732$ ;  $p=0,0220$ ).

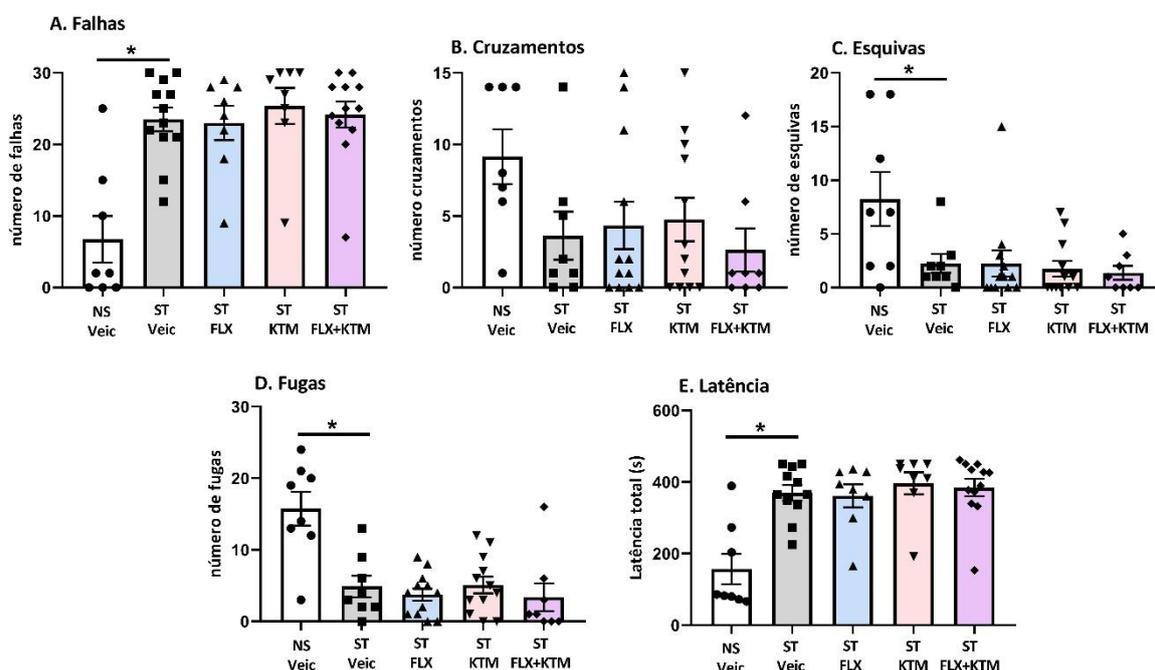


**Figura 47: Efeito do tratamento repetido com cetamina nas doses de 15mg ou 30mg sobre peso corporal dos animais submetidos ao desamparo aprendido.** Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n= 16 - 19$ ; ANOVA de duas vias seguida do teste de Tuckey. O asterisco (\*) representa diferença significativa entre os grupos KET30 e Estressado Veic (\* $p<0,05$ ).

### 5.5.3. Efeito do tratamento combinado de fluoxetina e cloridrato de dextrocetamina sobre o número de falhas, fugas, esquivas, cruzamentos e latência total em animais submetidos ao desamparo aprendido

A análise por Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn, mostrou que o número de falhas ( $H=15,17$ ;  $p=0,0168$ ; figura 56A), esquivas ( $H=8,851$ ;  $p=0,0401$ ; figura 48C) e fugas ( $H=15,30$ ;  $p=0,0258$ ; figura 48D) dos animais não estressados foi menor do que o número de falhas dos animais estressados e tratados com salina. Não houve diferença significativa no número de cruzamentos dos animais ( $H=6,629$ ;  $p=0,1568$ ; figura 48B).

A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett indicou que os animais não estressados apresentaram latência menor em fugir ou esquivar do choque do que os animais estressados ( $F_{(4, 42)}=10,10$ ;  $p<0,0001$ ; figura 48E). Não houve diferença significativa na latência dos animais tratados com fluoxetina ( $F_{(4, 42)}=10,10$ ;  $p=0,9989$ ; figura 48E), cetamina ( $F_{(4, 42)}=10,10$ ;  $p=0,9295$ ; figura 48E) ou a associação de fluoxetina e cetamina ( $F_{(4, 42)}=10,10$ ;  $p=0,9866$ ; figura 48E).



**Figura 48: Efeito do tratamento combinado de fluoxetina cetamina sobre o número de falhas, cruzamentos, esquivas, fugas e latência total.** FLX= fluoxetina (antidepressivo ISRS); KTM= cetamina; NST= animais não estressados; ST= animais estressados; VEIC = veículo. Os dados estão representados pela média  $\pm$  erro padrão da média;  $n= 08 - 12$ ; Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn e ANOVA de uma via seguida de Dunnett (latência). O asterisco (\*) indica diferença significativa entre o grupo NST VEIC e ST VEIC (\* $p<0,05$ ).

### 5.6. Discussão – Estudo 3

Considerando que os animais wistar hanover não responderam a nenhum dos tratamentos testados, investigamos a possibilidade de que eles responderiam ao tratamento com cetamina, uma vez que esta droga é utilizada para tratar depressão resistente ao tratamento. Desta maneira, fizemos alguns ajustes no protocolo experimental, incluindo um grupo não estressado a fim de comparar o estresse com o efeito da droga. Adicionalmente, optamos por não incluir uma terceira dose maior pois estudos demonstram que doses elevadas de cetamina induzem alterações na atividade locomotora dos animais, especialmente em esquema de administração repetida (WESTON; FITZGERALD; WATSON, 2021), efeito indesejado para o presente trabalho. De maneira semelhante ao observado em outros estudos, o tratamento repetido por 7 dias com cetamina não foi capaz de reduzir o número de falhas com nenhuma das doses testadas, no entanto, a pronunciada heterogeneidade dentro de um mesmo grupo é mantida, especialmente na dose de 30mg/kg (figura 46 A).

Tradicionalmente usada como anestésico dissociativo, a cetamina é um antagonista não competitivo dos receptores NMDA e os primeiros estudos mostrando seu efeito antidepressivo datam do início dos anos 2000, quando foi demonstrado que pacientes diagnosticados como resistentes ao tratamento reportaram melhora nos sintomas depressivos logo após a administração intravenosa em doses subanestésicas de cetamina, sendo estes efeitos sustentados por 3 dias (BERMAN et al., 2000). De maneira semelhante, estudos com animais demonstraram que o tratamento com cetamina é capaz de prevenir ou reverter as consequências do estresse em modelos como nado forçado (GARCIA et al., 2008; GHASEMI; RAZA; DEHPOUR, 2010; OWOLABI; AKANMU; ADEYEMI, 2014), estresse de restrição (TAN et al., 2017) e desamparo aprendido (KOIKE; IJIMA; CHAKI, 2011; YANG et al., 2015). O mecanismo de ação da cetamina ainda é alvo de muitas discussões pois, por ser uma mistura racêmica, foram reportados resultados divergentes com ambos os enantiômeros. O enantiômero S, conhecido como “*esketamina*” apresenta maior potência analgésica do que o enantiômero R e do que a mistura racêmica (MULLER et al., 2016), além de ser uma antagonista mais potente dos receptores NMDA

(PELTONIEMI et al., 2016), no entanto, os resultados de efeito antidepressivo em modelos animais utilizando o enantiômero R foram reportados como sendo mais rápido e tendo menos efeitos colaterais que a esketamina (ZHANG; LI; HASHIMOTO, 2014). Adicionalmente, estudos reportaram atividade antidepressiva dos metabólitos S-norketamina (HASHIMOTO; YANG, 2019) e hidroxinorketamina (SAŁAT et al., 2015). Além de antagonizarem os receptores NMDA outros mecanismos de ação têm sido propostos para a cetamina e seus metabólitos. Estudos com eletrofisiologia demonstraram que a administração de cetamina é capaz de evocar respostas dos receptores AMPA no hipocampo e CPFmedial de ratos (EL ISKANDRANI et al., 2015), além de induzir o aumento da expressão das subunidades GluA1 e GluA2 destes mesmos receptores (COLLO et al., 2019). Essa ativação dos receptores AMPA tem como consequência o aumento da expressão de mTOR e BDNF, ambos envolvidos nos processos de neurogênese e sinaptogênese (JOURDI et al., 2009). Corroborando estes dados, o tratamento com antagonistas AMPA é capaz de abolir o efeito tipo-antidepressivo nos animais tratados com cetamina, além de reduzir os níveis de mTOR e BDNF em animais submetidos ao teste de nado forçado (ZHOU et al., 2014). De maneira complementar, o tratamento com rapamicina, um inibidor da mTOR, é capaz também de abolir os efeitos antidepressivos da cetamina (HOLUBOVA et al., 2016). A metabolização da cetamina também se dá através de enzimas pertencentes à família do citocromo P450, especificamente pelas enzimas CYP2B6 e CYP3A4 (HIJAZI; BOULIEU, 2002) e estudos com humanos demonstraram que polimorfismos destes genes são capazes de comprometer a metabolização de certas drogas como antiretrovirais, anticâncer e antidepressivos (LANGMIA et al., 2021), por mecanismos semelhantes ao explicado no estudo 1. Assim, uma das possibilidades para ausência de efeitos tipo-antidepressivo no presente estudo, é o perfil farmacogenético dos animais wistar hannover e potenciais problemas de metabolização de fármacos. Além disso, no presente trabalho a cetamina utilizada foi a dextrocetamina, quimicamente designada como designada de S-(o-clorofenil)-2-(metilamino) ciclohexanona, ou seja, o enantiômero S ou esketamina que, embora tenha melhores resultados na clínica, para modelos animais se mostrou menos eficiente que o enantiômero R, como apontado anteriormente (MULLER et al., 2016). O uso de

uma cetamina racêmica ou até mesmo o teste com metabólitos isolados talvez seja capaz de induzir efeito tipo-antidepressivos na nova linhagem wistar hannovers. Adicionalmente, o efeito anestésico da cetamina se dá entre 1 a 5 minutos após a administração intraperitoneal, podendo durar entre 45 a 60 minutos após a injeção (YOUTH et al., 1973). Imediatamente após a administração intraperitoneal foi possível notar alterações no tônus muscular e locomoção descoordenada, sendo estes transitórios e rápidos. Dessa forma, o esquema de administração utilizando no presente trabalho (em dias alternados, sendo a última administração 24h antes da sessão teste), exclui a possibilidade de analgesia no momento do teste.

No presente estudo, observamos ainda que animais tratados com 30mg de cetamina em esquema de administração repetida, teve menor ganho de peso corporal comparados aos animais do grupo estressado-veículo (figura 47). Embora estudos demonstrem que o tratamento com memantina, um antagonista NMDA, é capaz de reduzir o consumo de comidas palatáveis em modelos de compulsão alimentar e, conseqüentemente, reduzir o peso corporal dos animais (POPIK et al., 2011) e que macacos tratados com cetamina apresentaram diminuição da ingesta de comida (SPRINGER; BAKER, 2007), não há nenhum dado na literatura correlacionando diretamente a administração de cetamina com a diminuição de peso corporal em roedores mantidos em condições normais ou comuns de biotério.

Aqui, novamente, seria interessante um estudo complementar das vias moleculares ativas nos animais que responderam ao tratamento com cetamina, visto que no grupo tratado com 30mg, a heterogeneidade se mantém. Em especial, a via do inflamassoma NLRP3, que foi demonstrada recentemente como parte do mecanismo de ação para efeito antidepressivo da cetamina (LI et al., 2019). Segundo os autores, a ativação do inflamassoma NLRP3 e o conseqüente aumento na liberação de IL-1 $\beta$  levaria à inibição dos receptores AMPA em neurônios hipocâmpais pós-sinápticos; o tratamento com cetamina, ao inibir a ativação do inflamassoma e diminuir a liberação de IL-1 $\beta$ , estimularia a expressão dos receptores AMPA, contribuindo para o efeito antidepressivo da droga (LI

et al., 2019). Segundo esta hipótese, seria interessante classificar os animais em responsivos e não responsivos, tal qual fizemos com os animais tratados com fluoxetina, e analisar os níveis de RNAm e níveis proteicos dos componentes do inflamassoma NLRP3, na tentativa de um melhor entendimento da linhagem wistar hannover.

A administração de cetamina comumente é feita em uma única dose e os efeitos antidepressivos são reportados horas após a administração, podendo perdurar por dias (HU et al., 2016; ZARATE et al., 2006). No entanto, estratégias de associação com antidepressivos têm sido utilizadas, especialmente em pacientes com ideações suicidas e em esquema de administração repetida (IONESCU et al., 2018; RODRÍGUEZ-MAYORAL et al., 2020). Outros estudos demonstram que a administração repetida de cetamina é capaz de aumentar em até 60% a melhora dos sintomas depressivos, inclusive em pacientes com depressão resistente ao tratamento (ZHENG et al., 2018). No entanto, no presente estudo a administração combinada de fluoxetina com cetamina não foi capaz de reduzir o número de falhas dos animais (figura 48 A). Como discutido anteriormente, a cetamina utilizada no presente trabalho é a dextrocetamina, também conhecida como S-ketamina (ou esketamina) e os resultados comportamentais com esta forma do fármaco são bastante controversos. Dessa maneira, estudos com associação da fluoxetina com o enantiômero R ou até mesmo com um dos metabólitos isolado da droga pode trazer melhores resultados sobre o perfil de resposta do wistar hannover.

## 6. Discussão Final e Conclusões

O presente trabalho investigou a participação da via P2X7-inflamassoma NLRP3 nas consequências comportamentais do estresse. A não responsividade ao tratamento farmacológico, advinda da pronunciada heterogeneidade dentro de um mesmo grupo, possibilitou que analisássemos os dados de maneira, separando os animais entre resilientes e suscetíveis em relação ao estresse e em responsivos e não responsivos em relação ao tratamento farmacológico. Uma das possibilidades para tal heterogeneidade de respostas pode ser a farmacogenética destes animais, uma vez que polimorfismos genéticos podem alterar a funcionalidade das enzimas que metabolizam os fármacos, principalmente os genes e enzimas da família do citocromo P450 (HICKS et al., 2015). A diminuição da expressão dos níveis de RNAm de NLRP3 e de P2X7 no hipocampo dorsal dos animais responsivos à fluoxetina, constituiu outra novidade do presente trabalho, uma vez que, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram diminuição dos níveis protéicos de P2X7 no hipocampo ventral de animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido (RIBEIRO et al., 2019). A modulação da via P2X7-NLRP3 parece fazer parte do mecanismo de ação da fluoxetina, uma vez que animais P2X7 KO responderam melhor ao tratamento com este fármaco (BASSO et al., 2009), além da fluoxetina ser capaz de inibir as correntes elétricas induzidas por agonistas P2X7 (*in vitro*) (WANG et al., 2016) e suprimir a expressão de NLRP3 em animais submetidos a estresse (LI et al., 2017). Estes mecanismos têm como convergência a ligação dos antidepressivos aos receptores TRKB, importantes para os processos de sobrevivência e neurogênese. Ao inibir a via P2X7-NLRP3, a fluoxetina contribui para a diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$ , citocina capaz de interferir na sinalização mediada por BDNF (TONG et al., 2008), além de se ligar diretamente aos receptores TRKB de maneira a promover maior liberação de BDNF, fortalecendo os processos de neurogênese e neuroplasticidade, importantes para o efeito antidepressivo (CASAROTTO et al., 2020).

Embora estudos anteriores do nosso grupo tenham demonstrado o efeito tipo-antidepressivo do tratamento repetido com BGG (RIBEIRO et al., 2019), no presente trabalho não observamos tal

efeito. Na verdade, maior dose testada no presente trabalho (100mg/kg) induziu um aumento no número de falhas, resultado contrário ao hipotetizado com o tratamento repetido com BBG. Apesar de ser possível a indução de um efeito tipo-ansio gênico no desamparo aprendido (DRUGAN et al., 1985), o que explicaria o elevado número de falhas nos animais tratados com a dose de 100mg, estudos apontam que o tratamento com BBG induz efeitos tipo-ansiolíticos tanto em camundongos (SILVA et al., 2019) quanto em ratos (HONG et al., 2020). Ao analisarmos o número de cruzamentos dos animais tratados com 100mg, observamos pronunciada hipolocomoção, nos permitindo estimar que as falhas em fugir ou escapar dos choques são uma consequência da atividade locomotora reduzida e não um efeito pró-depressivo do tratamento farmacológico. De maneira semelhante ao BBG, o tratamento com inibidor de inflamassoma NLRP3, o MCC950, também induziu aumento no número de falhas nos animais tratados com 30mg. No entanto, aqui, uma possibilidade é a indução de um efeito analgésico do MCC950, uma vez que há dados demonstrando que até mesmo o tratamento agudo com o composto foi capaz de induzir analgesia em camundongos (KHAN et al., 2018).

O tratamento com cetamina consiste em uma estratégia clínica para indivíduos com depressão resistente ao tratamento (ZARATE et al. 2007). Assim, frente à não responsividade dos animais utilizados no presente estudo, decidimos avaliar se o tratamento com cetamina seria capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo nos wistar hannover. No entanto, não foi possível observar tal efeito em nenhuma das doses testadas. Uma vez que a última administração do fármaco se deu 24h antes da sessão teste, excluimos o efeito analgésico nestes resultados, já que a cetamina induz analgesia entre 1 a 5 minutos após a administração, tendo este efeito a duração entre 45 a 60 minutos (YOUTH et al., 1973). Uma possibilidade é o tipo de cetamina utilizada, visto que utilizamos o enantiômero S (ou esketamina) e estudos demonstram que o enantiômero R apresenta melhores resultados em modelos animais de depressão (ZHANG; LI; HASHIMOTO, 2014). Além disso, também foi demonstrado que, semelhante à fluoxetina, a cetamina também é metabolizada por enzimas pertencentes à família do citocromo P450, sendo, portanto, influenciada por polimorfismos nos genes

que codificam essas enzimas (HIJAZI; BOULIEU, 2002), nos levando a considerar novamente a possibilidade de características farmacogenéticas dos wistar hannover.

A associação de compostos de diferentes classes é outra estratégia clínica para o tratamento de indivíduos com depressão resistente ao tratamento (PHILIP et al., 2010). Nesse sentido, a associação de fluoxetina e MCC950, um inibidor do inflamassoma se mostrou uma estratégia interessante para prevenir o estabelecimento do desamparo nos animais expostos ao estresse. Embora pareça uma boa estratégia, considerando que pacientes com doenças inflamatórias e depressão em comorbidade relatam melhoras nos sintomas depressivos, a associação de fluoxetina com AINEs tem como efeitos colaterais o sangramento gastrointestinal e o risco aumentado de infarto do miocárdio (ANDRADE, 2012; ANDRADE et al., 2010; VARAS-LORENZO et al., 2013). Assim, um composto com perfil farmacológico mais seguro se faz necessário e um candidato seria o MCC950. A análise molecular dos animais tratados com a associação dos dois fármacos nos permitiria entender melhor qual o mecanismo do efeito tipo-antidepressivo induzido e se realmente o MCC950 é este composto com perfil farmacológico mais seguro. Uma outra proposta seria realizar a análise das estruturas envolvidas na neurobiologia da depressão (CPF e HPC) e também da reatividade das micróglia destes animais, correlacionando com os níveis de citocinas pró-inflamatórias antes do início do tratamento e se há divergência destes parâmetros entre as drogas testadas, na tentativa de entender melhor os possíveis resultados divergentes sem ter que classificá-los de maneira simplória apenas como “negativos”.

Embora a linhagem wistar hannover seja tradicionalmente utilizada em estudos para toxicologia e farmacologia, os animais fornecidos pelo câmpus de Ribeirão Preto não atenderam às necessidades para a realização do presente estudo de maneira satisfatória, uma vez que fármacos como fluoxetina e cetamina, com dados consolidados na literatura sobre seus efeitos tipo-antidepressivos, apresentaram resultados heterogêneos e sem diferença estatística quando comparados com o grupo controle em experimentos independentes e realizados ao longo de todo o

trabalho. Adicionalmente, dificuldades em reproduzir dados da literatura utilizando o nado forçado também foram vivenciadas em nosso grupo. Visto que há comprovada diferença dos animais em testes comportamentais de acordo com o fornecedor da linhagem, condições de alojamento e até mesmo a maneira como são feitos os cruzamentos para reprodução, sugerimos uma melhor investigação dos parâmetros fisiológicos e comportamentais da linhagem de maneira a avaliar a viabilidade do fornecimento como possibilidade única de linhagem de ratos no campus.

## 7. Referências Bibliográficas

ADACHI, M. et al. Selective Loss of BDNF in the Dentate Gyrus Attenuates Antidepressant Efficacy. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 7, 2008.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA. **DSM-V-TR - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. [s.l.: s.n.].

ANDRADE, C. et al. Serotonin reuptake inhibitor antidepressants and abnormal bleeding: a review for clinicians and a reconsideration of mechanisms. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1565–1575, dez. 2010.

ANDRADE, C. Drug Interactions in the Treatment of Depression in Patients With Ischemic Heart Disease. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 5135, 15 dez. 2012.

ANDRADE, C. Antidepressant augmentation with anti-inflammatory agents. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 75, n. 9, p. 975–977, 1 set. 2014.

ANIS, N. A. et al. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. **British Journal of Pharmacology**, v. 79, n. 2, 1983.

ARENDET, D. H. et al. Contrasting hippocampal and amygdalar expression of genes related to neural plasticity during escape from social aggression. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 5, 2012.

ARICIOGLU, F. et al. Antidepressant-like Effects Induced by Chronic Blockade of the Purinergic 2X7 Receptor through Inhibition of Non-like Receptor Protein 1 Inflammasome in Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression in Rats. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 261, 1 maio 2019.

ARNDT, D. L.; PETERSON, C. J.; CAIN, M. E. Differential Rearing Alters Forced Swim Test Behavior, Fluoxetine Efficacy, and Post-Test Weight Gain in Male Rats. **PloS one**, v. 10, n. 7, 8 jul. 2015.

AXELROD, J.; WHITBY, L. G.; HERTTING, G. Effect of psychotropic drugs on the uptake of H3-norepinephrine by tissues. **Science**, v. 133, n. 3450, 1961.

BADYAEV, A. V. Role of stress in evolution: From individual adaptability to evolutionary adaptation. In: **Variation**. [s.l.: s.n.].

BARTLETT, R. et al. P2X7 antagonism using brilliant blue G reduces body weight loss and prolongs survival in female SOD1G93A amyotrophic lateral sclerosis mice. **PeerJ**, v. 2017, n. 3, p. e3064, 1 mar. 2017.

BASSO, A. M. et al. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. **Behavioural brain research**, v. 198, n. 1, p. 83–90, 2 mar. 2009.

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

BERLIM, M. T.; TURECKI, G. Definition, assessment, and staging of treatment-resistant refractory major depression: A review of current concepts and methods. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 52, n. 1, p. 46–54, 1 jan. 2007.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351–354, 15 fev. 2000.

BESKOW, J. et al. DETERMINATION OF MONOAMINE AND MONOAMINE METABOLITES IN THE HUMAN BRAIN: POST MORTEM STUDIES IN A GROUP OF SUICIDES AND IN A CONTROL GROUP. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 53, n. 1, 1976.

BIANCHI, B. et al. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. **Elsevier**, [s.d.].

BIANCHI, B. R. et al. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, 1999.

BLALOCK, J. A.; JOINER, T. E. Interaction of cognitive avoidance coping and stress in predicting depression/anxiety. **Cognitive Therapy and Research**, v. 24, n. 1, p. 47–65, fev. 2000.

BLIER, P.; ABBOTT, F. V.; UNIT, N. P. Putative mechanisms of action of antidepressant drugs in affective and anxiety disorders and pain. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 37–43, 2001.

BLIER, P.; EL MANSARI, M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, p. 20120536, 2013.

BLOKHIN, I. O. et al. Molecular mechanisms of psychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 146, p. 105136, 1 dez. 2020.

BONACCORSO, S. et al. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon- $\alpha$ -based immunotherapy are related to interferon- $\alpha$ -induced changes in the serotonergic system. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 22, n. 1, 2002.

BOOIJ, L. et al. DNA methylation of the serotonin transporter gene in peripheral cells and stress-related changes in hippocampal volume: A study in depressed patients and healthy controls. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

BOUCHER, A. A. et al. Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. **Neuroscience**, v. 189, 2011.

BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Medicine**, 2011.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. **Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling** *Nature Reviews Immunology*, 2016.

BURCH, R. M. et al. NMDA Receptor Glycine Site Modulators as Therapeutics for Depression: Rapastinel has Antidepressant Activity without Causing Psychotomimetic Side Effects. **Current neuropharmacology**, 2016.

BURGDORF, J. et al. The long-lasting antidepressant effects of rapastinel (GLYX-13) are associated with a metaplasticity process in the medial prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience**, v. 308, 2015.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves and receptors. **Progress in biochemical pharmacology**, v. 16, p. 141–154, 1980.

CAPURON, L. et al. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. 5, 2002.

CARLSSON, A.; FUXE, K.; UNGERSTEDT, U. **The effect of imipramine of central 5-hydroxytryptamine neurons** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1968.

CASAROTTO, P. C. et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. **Cell**, v. 184, n. 5, p. 1299–1313.e19, 4 mar. 2021.

CHANDLER, D. J.; LAMPERSKI, C. S.; WATERHOUSE, B. D. Identification and distribution of projections from monoaminergic and cholinergic nuclei to functionally differentiated subregions of prefrontal cortex. **Brain Research**, v. 1522, 2013.

CISNEROS-MEJORADO, A. et al. **ATP Signaling in Brain: Release, Excitotoxicity and Potential Therapeutic Targets** *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2014.

CITROME, L. L.; KUMAR JHA, M. Anti-Inflammatory Treatments for Major Depressive Disorder: What's on the Horizon? **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 80, n. 6, p. 1049, 25 jun. 2019.

CLÉMENT, B. et al. Protein Solubilization: Attend to the Choice of Lysis Buffer Related papers Western Blotting Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1312 Ricardo Castillo A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection Sai Anant h Isolation of mitochondria from plant cell culture Chapter 4 Protein Solubilization: Attend to the Choice of Lysis Buffer. **Methods in Molecular Biology**, v. 869, 2004.

COLL, R. C. et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nature Medicine**, 2015a.

COLL, R. C. et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nature Medicine** 2015 21:3, v. 21, n. 3, p. 248–255, 16 fev. 2015b.

COLLO, G. et al. Ketamine increases the expression of GluR1 and GluR2  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunits in human dopaminergic neurons differentiated from induced pluripotent stem cells. **Neuroreport**, v. 30, n. 3, p. 207–212, 1 jan. 2019.

COOPER, G. M. Regulation of Transcription in Eukaryotes. 2000.

CORREIA-MELO, F. S. et al. Efficacy and safety of adjunctive therapy using esketamine or racemic ketamine for adult treatment-resistant depression: A randomized, double-blind, non-inferiority study. **Journal of Affective Disorders**, v. 264, p. 527–534, 1 mar. 2020.

COSTA-JUNIOR, H. M.; VIEIRA, F. S.; COUTINHO-SILVA, R. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 1, p. 7, 2011.

CSÖLLE, C. et al. Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. **PLoS one**, v. 8, n. 6, p. e66547, 2013.

CURÉ, M.; ROLINAT, J. P. Behavioral heterogeneity in Sprague-Dawley rats. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 4, p. 771–774, 1 abr. 1992.

DE ALMEIDA MAGALHÃES, T. et al. Maternal separation affects expression of stress response genes and increases vulnerability to ethanol consumption. **Brain and Behavior**, v. 8, n. 1, 2018.

DE AZEVEDO CARDOSO, T. et al. Neurotrophic factors, clinical features and gender differences in depression. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 8, 2014.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. **Stress and the brain: From adaptation to disease** *Nature Reviews Neuroscience*, 2005.

DE LA GARZA, R. et al. Recombinant human interferon- $\alpha$  does not alter reward behavior, or neuroimmune and neuroendocrine activation in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 781–792, jun. 2005.

DELGADO, P. L. **Depression: The case for a monoamine deficiency**. *Journal of Clinical Psychiatry. Anais...* 2000.

DELLA, F. P. et al. Treatment with tianeptine induces antidepressive-like effects and alters the neurotrophin levels, mitochondrial respiratory chain and cycle Krebs enzymes in the brain of maternally deprived adult rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 1, 2013.

DIMMITT, S. B.; STAMPFER, H. G. Low drug doses may improve outcomes in chronic disease. **Medical Journal of Australia**, v. 191, n. 9, p. 511–513, 1 nov. 2009.

DINIZ, C. R. A. Antidepressant-like effects of P2 purinergic antagonist PPADS is dependent on serotonergic and noradrenergic integrity. p. 1–21, 2016.

DODD, S. et al. **Monitoring for antidepressant-associated adverse events in the treatment of patients with major depressive disorder: An international consensus statement** *World Journal of Biological Psychiatry* Taylor and Francis Ltd, , 4 jul. 2018.

DOMINO, E. F.; CHODOFF, P.; CORSSSEN, G. Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 6, n. 3, 1965.

DRUGAN, R. C. et al. An anxiogenic benzodiazepine receptor ligand induces learned helplessness. **European journal of pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 453–457, 31 jul. 1985.

D'SOUZA, D. N. et al. Fluoxetine-induced changes in body weight and 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated hormone secretion in rats on a tryptophan-deficient diet. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 2, 2004.

DU, R. H. et al. Fluoxetine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation: Implication in Depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 9, p. 1–9, 1 set. 2016.

DUCLOT, F. et al. Individual differences in novelty-seeking behavior in rats as a model for psychosocial stress-related mood disorders. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 2, p. 296–305, 3 ago. 2011.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. **A molecular and cellular theory of depression** *Archives of General Psychiatry*, 1997.

DUMAN, R. S.; LI, N. **A neurotrophic hypothesis of depression: Role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. **A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders***Biological Psychiatry*, 2006.

EL ISKANDRANI, K. S. et al. Impact of subanesthetic doses of ketamine on AMPA-mediated responses in rats: An in vivo electrophysiological study on monoaminergic and glutamatergic neurons. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 29, n. 7, p. 792, 19 jul. 2015.

FABBRI, C. et al. **Consensus paper of the WFSBP Task Force on Genetics: Genetics, epigenetics and gene expression markers of major depressive disorder and antidepressant response***World Journal of Biological Psychiatry*, 2017.

FABBRI, C. et al. Pleiotropic genes in psychiatry: Calcium channels and the stress-related FKBP5 gene in antidepressant resistance. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, 2018.

FANG, F. C.; CASADEVALL, A. Reductionistic and Holistic Science. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 4, p. 1401–1404, abr. 2011.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 14 jan. 2010.

FAROOQ, R. K. et al. A P2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 97, 2018.

FEBBRARO, F. et al. Neuronal substrates underlying stress resilience and susceptibility in rats. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017.

FEKADU, A. et al. What happens to patients with treatment-resistant depression? A systematic review of medium to long term outcome studies. **Journal of Affective Disorders**, v. 116, n. 1–2, p. 4–11, 1 jul. 2009.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death and Differentiation**, 2007.

FERNÁNDEZ MACEDO, G. V. et al. Effects of fluoxetine on CRF and CRF1 expression in rats exposed to the learned helplessness paradigm. **Psychopharmacology**, v. 225, n. 3, p. 647–659, 2013.

FERRER, A. et al. BDNF genetic variants and methylation: effects on cognition in major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2019.

FIELDS, C. et al. Celecoxib or naproxen treatment does not benefit depressive symptoms in persons aged 70 and over: findings from a randomized controlled trial. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 505, 2012.

FINN, P. D. et al. Serotonergic Neurons Are Targets for Leptin in the Monkey\*. 2001.

FLINT, J.; KENDLER, K. S. **The Genetics of Major Depression***Neuron*, 5 fev. 2014.

CALLAHAN, F. Fluoxetine increases the anorectic and long-term dopamine-depleting effects of phentermine -**Synapse - Wiley Online Library**. 2000

FOSTER, J. R.; FROST, D. The History of the Rat. **Boorman's Pathology of the Rat**, p. 7–12, 1 jan. 2018.

FRANK, E. et al. Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 1, p. 60–71, fev. 2006.

FUJII, S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: the role of extracellular ATP in hippocampal long-term potentiation. **Journal of pharmacological sciences**, 2004.

GAEDIGK, A. et al. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 234–242, fev. 2008.

GAMARO, G. D. et al. Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 3, p. 312–317, 1 set. 2008.

GARCIA, L. S. B. et al. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140–144, 1 jan. 2008.

GAYNES, B. N. et al. Defining treatment-resistant depression. **Depression and Anxiety**, v. 37, n. 2, p. 134–145, 1 fev. 2020.

GHASEMI, M.; RAZA, M.; DEHPUR, A. R. NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 24, n. 4, p. 585–594, 2010.

GIBB, J. et al. Synergistic and additive actions of a psychosocial stressor and endotoxin challenge: Circulating and brain cytokines, plasma corticosterone and behavioral changes in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 4, 2008.

GJERSTAD, J. K.; LIGHTMAN, S. L.; SPIGA, F. **Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility** Stress Taylor and Francis Ltd, , 3 set. 2018.

GUSTIN, A. et al. NLRP3 inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes. **PLoS ONE**, 2015.

HAJSZAN, T. et al. Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 5, p. 392–400, 1 mar. 2009.

HASHIMOTO, K.; YANG, C. Is (S)-norketamine an alternative antidepressant for esketamine? **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 269, n. 7, p. 867–868, 1 out. 2019.

HEFTI, F. et al. Neurotrophic Factors: What Are They and What Are They Doing? In: **Neurotrophic Factors**. [s.l.: s.n.].

HEIM, C. et al. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 6, 2008.

HEJJAS, K. et al. Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: A dimensional approach. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, 2009.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603, 1 abr. 2016.

HICKS, J. K. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of selective serotonin reuptake inhibitors. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 98, n. 2, p. 127–134, 1 ago. 2015.

HIJAZI, Y.; BOULIEU, R. Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 30, n. 7, p. 853–858, 2002.

HO, Y. C.; WANG, S. Adult neurogenesis is reduced in the dorsal hippocampus of rats displaying learned helplessness behavior. **Neuroscience**, v. 171, n. 1, p. 153–161, 24 nov. 2010.

HODES, G. E. et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2014.

HOLMES, A.; CHRISTELIS, N.; ARNOLD, C. Depression and chronic pain. **The Medical journal of Australia**, v. 199, n. S6, p. S17–S20, 16 set. 2013.

HOLSBOER, F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: Implications for therapy. **Journal of Affective Disorders**, v. 62, p. 77–91, 2001.

HOLUBOVA, K. et al. Rapamycin blocks the antidepressant effect of ketamine in task-dependent manner. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 11, p. 2077–2097, 1 jun. 2016.

HONG, S. et al. The P2X7 receptor in activated microglia promotes depression- and anxiety-like behaviors in lithium-pilocarpine induced epileptic rats. **Neurochemistry international**, v. 138, 1 set. 2020.

HOWARD, D. M. et al. Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. **Nature neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 343–352, 1 mar. 2019.

HU, Y. D. et al. Single i.v. ketamine augmentation of newly initiated escitalopram for major depression: results from a randomized, placebo-controlled 4-week study. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 3, p. 623–635, 1 fev. 2016.

HUANG, Y. et al. Cannabidiol protects livers against nonalcoholic steatohepatitis induced by high-fat high cholesterol diet via regulating NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome pathway. **Journal of Cellular Physiology**, 2019.

ILLES, P.; KHAN, T. M.; RUBINI, P. Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist? **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 30, p. 7049, 26 jul. 2017.

IONESCU, D. F. et al. Repeat-dose ketamine augmentation for treatment-resistant depression with chronic suicidal ideation: A randomized, double blind, placebo controlled trial. 2018.

IWATA, M. et al. Psychological stress activates the inflammasome via release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor. **Biological Psychiatry**, 2016a.

IWATA, M. et al. Learned helplessness activates hippocampal microglia in rats: A potential target for the antidepressant imipramine. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 150–151, p. 138–146, 1 nov. 2016b.

JAENISCH, R.; BIRD, A. **Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals** *Nature Genetics*, 2003.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, 2018.

JANUAR, V. et al. BDNF promoter methylation and genetic variation in late-life depression. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 8, 25 ago. 2015.

JOURDI, H. et al. Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 27, 2009.

KALE, P. P. et al. Caffeine-induced Augmentation of Antidepressant Therapy. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 2, n. 6, p. 282–286, 1 dez. 2010.

KANEKO, N. et al. Suppression of cell proliferation by interferon-alpha through interleukin-1 production in adult rat dentate gyrus. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 12, 2006.

KANG, H. J. et al. BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 151, n. 2, 2013a.

KANG, H. J. et al. Association of SLC6A4 methylation with early adversity, characteristics and outcomes in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 44, 2013b.

KAUFMANN, F. N. et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. **Brain, behavior, and immunity**, v. 64, p. 367–383, 1 ago. 2017.

KELLER, S. et al. Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 3, 2010.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The Epidemiology of Depression Across Cultures. **Annual Review of Public Health**, 2013.

KHAN, N. et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome as a potential target for multiple sclerosis induced central neuropathic pain. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 77–86, 1 fev. 2018.

KIM, Y. K. et al. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 5, 2007.

KÖHLER, O. et al. **Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials** *JAMA Psychiatry*, 2014.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; CHAKI, S. Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. **Behavioural brain research**, v. 224, n. 1, p. 107–111, 10 out. 2011.

KOJIMA, M. et al. Depression, inflammation, and pain in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Care and Research**, v. 61, n. 8, 2009.

KONSMAN, J. P. et al. Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 12, 2008.

LANGMIA, I. M. et al. CYP2B6 Functional Variability in Drug Metabolism and Exposure Across Populations—Implication for Drug Safety, Dosing, and Individualized Therapy. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 1205, 12 jul. 2021.

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

LAPIN, I. P.; OXENKRUG, G. F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. **Lancet**, v. 293, n. 7586, 1969.

LI, J. M. et al. Ketamine may exert antidepressant effects via suppressing NLRP3 inflammasome to upregulate AMPA receptors. **Neuropharmacology**, v. 146, p. 149–153, 1 mar. 2019.

LI, J. RU et al. Fluoxetine-enhanced autophagy ameliorates early brain injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation following subarachnoid hemorrhage in rats. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, 13 set. 2017.

LI, Z. et al. Major Depressive Disorder: Advances in Neuroscience Research and Translational Applications. **Neuroscience Bulletin**, 13 fev. 2021.

LIN, Y. et al. Sex differences in the effects of acute and chronic stress and recovery after long-term stress on stress-related brain regions of rats. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. 9, 2009.

LIU, C. et al. Inhibitory Effect of Cannabidiol on the Activation of NLRP3 Inflammasome Is Associated with Its Modulation of the P2X7 Receptor in Human Monocytes. **Journal of Natural Products**, 2020.

LÓPEZ-CRUZ, L.; SALAMONE, J. D.; CORREA, M. Caffeine and Selective Adenosine Receptor Antagonists as New Therapeutic Tools for the Motivational Symptoms of Depression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JUN, 1 jun. 2018.

LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 30 abr. 2009.

LUCAE, S. et al. P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 16, p. 2438–2445, 2006.

LUO, Y. et al. MCC950 attenuated early brain injury by suppressing NLRP3 inflammasome after experimental SAH in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 146, p. 320–326, 1 mar. 2019.

MADRIGAL, J. L. M. et al. The increase in TNF- $\alpha$  levels is implicated in NF- $\kappa$ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 155–163, 2002.

MAENG, S.; ZARATE, C. A. **The role of glutamate in mood disorders: Results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects** **Current Psychiatry Reports**, 2007.

MAES, M. et al. A further exploration of the relationships between immune parameters and the HPA-axis activity in depressed patients. **Psychological Medicine**, v. 21, n. 2, p. 313–320, 1991.

MARMIGÈRE, F. et al. **Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats***Hippocampus*, 2003.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, 2002.

MARTIS, L. S. et al. The effect of rat strain and stress exposure on performance in touchscreen tasks. **Physiology & behavior**, v. 184, p. 83–90, 1 fev. 2018.

MATAR-MERHEB, R. et al. Structuring Detergents for Extracting and Stabilizing Functional Membrane Proteins. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. e18036, 2011.

MCCORMACK, J. P.; ALLAN, G. M.; VIRANI, A. S. Is bigger better? An argument for very low starting doses. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 183, n. 1, p. 65–69, 11 jan. 2011.

MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, 2015.

MERENS, W. et al. The effects of experimentally lowered serotonin function on emotional information processing and memory in remitted depressed patients. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, n. 6, 2008.

METZGER, M. W. et al. Heterozygosity for the mood disorder-associated variant Gln460Arg alters P2X7 receptor function and sleep quality. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 48, 2017.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. **The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target***Nature Reviews Immunology*, 2016.

MONIF, M. et al. The P2X7 Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X7R Pore. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3781–3791, 25 mar. 2009.

MONTEGGIA, L. M. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Conditional Knockouts Show Gender Differences in Depression-Related Behaviors. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 2, 2007.

MOSKAL, J. et al. The Development of Rapastinel (Formerly GLYX-13); A Rapid Acting and Long Lasting Antidepressant. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 1, 2016.

MULLER, J. et al. Ketamine enantiomers in the rapid and sustained antidepressant effects. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 185, jun. 2016.

NAERT, G. et al. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 46, n. 1, 2011.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012.

NUNES, P. V. et al. Low brain-derived neurotrophic factor levels in post-mortem brains of older adults with depression and dementia in a large clinicopathological sample. **Journal of Affective Disorders**, v. 241, 2018.

O'CONNOR, K. A. et al. Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. **Brain Research**, v. 991, n. 1–2, 2003.

OKADA, S. et al. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 53, n. 1, 2014.

OSWALD, I.; BREZINOVA, V.; DUNLEAVY, D. L. **On the slowness of action of tricyclic antidepressant drugs.** *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 1972.

OTROKOCZI, L.; KITTEL, Á.; SPERLÁGH, B. P2X7 Receptors Drive Spine Synapse Plasticity in the Learned Helplessness Model of Depression. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 10, p. 813–822, 1 out. 2017.

OTTE, C. (Review) Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, 2016.

OVERSTREET, D. H. et al. Nerve growth factor (NGF) has novel antidepressant-like properties in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 4, 2010.

OWOLABI, R. A.; AKANMU, M. A.; ADEYEMI, O. I. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on fluoxetine-induced antidepressant-related behavior using the forced swimming test. **Neuroscience letters**, v. 566, p. 172–176, 30 abr. 2014.

PALM, S. et al. When is a Wistar a Wistar? Behavioral profiling of outbred Wistar rats from five different suppliers using the MCSF test. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 1–2, p. 128–137, 30 nov. 2011.

PANDEY, G. N. et al. Innate immunity in the postmortem brain of depressed and suicide subjects: Role of Toll-like receptors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 75, 2019.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. **NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease** *Nature Reviews Neuroscience*, 2013.

PAPADIMITROPOULOU, K. et al. Comparative efficacy and tolerability of pharmacological and somatic interventions in adult patients with treatment-resistant depression: a systematic review and network meta-analysis. v. 33, n. 4, p. 701–711, 3 abr. 2017.

PELTONIEMI, M. A. et al. Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 55, n. 9, p. 1059–1077, 1 set. 2016.

PENN, E.; TRACY, D. K. The drugs don't work? Antidepressants and the current and future pharmacological management of depression. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 2, n. 5, 2012.

PEREIRA, V. S.; HIROAKI-SATO, V. A. **A brief history of antidepressant drug development: From tricyclics to beyond ketamine** *Acta Neuropsychiatrica* Cambridge University Press, 1 dez. 2018.

PETERSEN, T. et al. A survey of prescribing practices in the treatment of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2002.

PIZARRO, J. M. et al. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. **Brain Research**, v. 1025, n. 1–2, 2004.

POLESZAK, E. et al. Antidepressant-Like Activity of Typical Antidepressant Drugs in the Forced Swim Test and Tail Suspension Test in Mice Is Augmented by DMPX, an Adenosine A2A Receptor Antagonist. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 2, p. 344, 1 fev. 2019.

POPIK, P. et al. Memantine reduces consumption of highly palatable food in a rat model of binge eating. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 477–485, 23 fev. 2011.

POPOVA, V. et al. Efficacy and safety of flexibly dosed esketamine nasal spray combined with a newly initiated oral antidepressant in treatment-resistant depression: A randomized double-blind active-controlled study. **American Journal of Psychiatry**, v. 176, n. 6, p. 428–438, 1 jun. 2019.

PRATHER, A. A. Sickness Behavior. In: **Encyclopedia of Behavioral Medicine**. [s.l.] Springer New York, 2013. p. 1786–1788.

RASMUSSEN, A. M.; SHI, L.; DUMAN, R. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 2, 2002.

REED, A. L. et al. Treatment with escitalopram but not desipramine decreases escape latency times in a learned helplessness model using juvenile rats. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 2, p. 249–259, ago. 2009.

RIBEIRO, D. E. et al. Reduced P2X receptor levels are associated with antidepressant effect in the learned helplessness model. **PeerJ**, v. 7, n. 10, 2019.

RICHTER, S. H. et al. A matter of timing: Harm reduction in learned helplessness. **Behavioral and Brain Functions**, v. 10, n. 1, 3 nov. 2014.

RODRÍGUEZ-MAYORAL, O. et al. Ketamine as augmentation for the treatment of major depression and suicidal risk in advanced cancer: Case report. **Palliative & supportive care**, v. 18, n. 1, p. 110–112, 1 fev. 2020.

ROY, A.; JONG, J.; LINNOILA, M. Cerebrospinal Fluid Monoamine Metabolites and Suicidal Behavior in Depressed Patients: A 5-Year Follow-up Study. **Archives of General Psychiatry**, v. 46, n. 7, 1989.

RUHÉ, H. G. et al. Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 137, n. 1–3, p. 35–45, 1 mar. 2012.

RUHÉ, H. G.; MASON, N. S.; SCHENE, A. H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 4, p. 331–59, abr. 2007.

RUSSO, S. J. et al. Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience** 2012 15:11, v. 15, n. 11, p. 1475–1484, 14 out. 2012.

SAARELAINEN, T. et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 1, 2003.

SAAVEDRA, K. et al. **Epigenetic modifications of major depressive disorder** *International Journal of Molecular Sciences*, 2016.

SAŁAT, K. et al. Antidepressant-like effects of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in forced swim test: Role of activity at NMDA receptor. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 301–307, 22 ago. 2015.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, 2012.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders. In: [s.l: s.n.]. p. 509–522.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. **The Inflammasomes**Cell, 2010.

SCHULTE-HERBRÜGGEN, O. et al. Differential regulation of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of learned helplessness. **Experimental Neurology**, v. 202, n. 2, 2006.

SEEDAT, S. et al. Cross-national associations between gender and mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Archives of General Psychiatry**, 2009.

SELIGMAN, M. E.; MAIER, S. F. FAILURE TO ESCAPE TRAUMATIC SHOCK. **Journal of Experimental Psychology**, v. 74, n. 1, p. 1–9, maio 1967.

SELIKOFF, I. J.; ROBITZEK, E. H. Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid. **Diseases of the chest**, v. 21, n. 4, 1952.

SHAO, X.; ZHU, G. **Associations Among Monoamine Neurotransmitter Pathways, Personality Traits, and Major Depressive Disorder**Frontiers in PsychiatryFrontiers Media S.A., 13 maio 2020. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 23 mar. 2021

SHELDRIK, A. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals – a proof of concept study. **European Psychiatry**, v. 46, 2017.

SHER, Y.; LOLAK, S.; MALDONADO, J. R. The impact of depression in heart disease. **Current Psychiatry Reports**, v. 12, n. 3, p. 255–264, 25 jun. 2010.

SHERMAN, A. D.; PETTY, F. Neurochemical basis of the action of antidepressants on learned helplessness. **Behavioral and Neural Biology**, v. 30, n. 2, p. 119–134, 1 out. 1980.

SHERMAN, A. D.; SACQUITNE, J. L.; PETTY, F. Specificity of the learned helplessness model of depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 1982.

SILVA, C. S. DA et al. LPS-Induced Systemic Neonatal Inflammation: Blockage of P2X7R by BBG Decreases Mortality on Rat Pups and Oxidative Stress in Hippocampus of Adult Rats. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 13, 6 nov. 2019.

SILVERSTEIN, W. K. et al. Neurobiological predictors of response to dorsolateral prefrontal cortex repetitive transcranial magnetic stimulation in depression: a systematic review. **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 12, p. 871–891, 1 dez. 2015.

SIM, S. C.; INGELMAN-SUNDBERG, M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: A peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. **Human Genomics**, 2010.

SINGH, A. Negative feedback through mRNA provides the best control of gene-expression noise. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 10, n. 3, p. 194–200, set. 2011.

SMALL, M. A. et al. Similarities and dissimilarities between psychiatric cluster disorders. **Molecular Psychiatry** **2021** **26:9**, v. 26, n. 9, p. 4853–4863, 27 jan. 2021.

SONG, C.; ZHANG, Y.; DONG, Y. Acute and subacute IL-1 $\beta$  administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: Possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 7 maio 2013.

SPRINGER, D. A.; BAKER, K. C. Effect of ketamine anesthesia on daily food intake in *Macaca mulatta* and *Cercopithecus aethiops*. **American Journal of Primatology**, v. 69, n. 10, p. 1080–1092, 1 out. 2007.

STANQUINI, L. A. et al. Repeated treatment with nitric oxide synthase inhibitor attenuates learned helplessness development in rats and increases hippocampal BDNF expression. **Acta Neuropsychiatr**, p. 1–10, 2017.

STEINER, J. et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: Elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. **Journal of Psychiatric Research**, v. 42, n. 2, 2008.

STINGL, J. C.; BROCKMÖLLER, J.; VIVIANI, R. Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 3, p. 273–287, mar. 2013.

STRAWBRIDGE, R. et al. Augmentation therapies for treatment-resistant depression: systematic review and meta-analysis. **The British journal of psychiatry: the journal of mental science**, v. 214, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2019.

SURPRENANT, A. et al. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). **Science**, 1996.

SURPRENANT, A.; ALAN NORTH, R. Signaling at purinergic P2X receptors. **Annual review of physiology**, v. 71, p. 333–359, mar. 2009.

TAN, S. et al. Ketamine Alleviates Depressive-Like Behaviors via Down-Regulating Inflammatory Cytokines Induced by Chronic Restraint Stress in Mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 40, n. 8, p. 1260–1267, 2017.

TELLES, M. M.; GUIMARÃES, R. B.; RIBEIRO, E. B. Effect of leptin on the acute feeding-induced hypothalamic serotonergic stimulation in normal rats. **Regulatory Peptides**, v. 115, n. 1, p. 11–18, 15 ago. 2003.

TONG, L. et al. Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 9, p. 1380–1393, set. 2008.

TRAUTMANN, S.; REHM, J.; WITTCHEM, H. The economic costs of mental disorders. **EMBO reports**, 2016.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 185, n. 1, 1990.

TURNER, E. H. **Esketamine for treatment-resistant depression: seven concerns about efficacy and FDA approval***The Lancet Psychiatry* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2019.

VALENTINE, G. et al. Differential effects of chronic antidepressant treatment on shuttle box escape deficits induced by uncontrollable stress. **Psychopharmacology**, v. 200, n. 4, p. 585–596, nov. 2008.

VAN SCHAİK, R. H. N. et al. Pharmacogenetics in Psychiatry: An Update on Clinical Usability. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1443, 11 set. 2020.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, 2002.

VARAS-LORENZO, C. et al. Myocardial infarction and individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs meta-analysis of observational studies. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 22, n. 6, p. 559–570, jun. 2013.

VIALOU, V. et al. **Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action***Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2013.

VILLAGRA, A.; SOTOMAYOR, E. M.; SETO, E. Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation. **Oncogene**, v. 29, n. 2, p. 157–173, jan. 2010.

VOLONTE, C. et al. P2X7 Receptors: Channels, Pores and More. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, 2012.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, 2015.

WAN, L. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 242, 1 dez. 2018.

WANG, W. et al. Effects of antidepressants on P2X7 receptors. **Psychiatry research**, v. 242, p. 281–287, 30 ago. 2016.

WECKMANN, K. et al. Ketamine's Effects on the Glutamatergic and GABAergic Systems: A Proteomics and Metabolomics Study in Mice. **Complex Psychiatry**, v. 5, n. 1, p. 42–51, 2019.

WEISS, G. F. et al. Effect of hypothalamic and peripheral fluoxetine injection on natural patterns of macronutrient intake in the rat. **Psychopharmacology** 1991 105:4, v. 105, n. 4, p. 467–476, dez. 1991.

WESTON, R. G.; FITZGERALD, P. J.; WATSON, B. O. Repeated Dosing of Ketamine in the Forced Swim Test: Are Multiple Shots Better Than One? **Frontiers in psychiatry**, v. 12, 11 maio 2021.

WHITEFORD, H. A. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, 2013.

WIENER, C. D. et al. Serum levels of nerve growth factor (NGF) in patients with major depression disorder and suicide risk. **Journal of Affective Disorders**, v. 184, 2015.

WILLARD, S. S.; KOOCHEKPOUR, S. **Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways***International Journal of Biological Sciences*, 2013.

WOOD, S. K.; BHATNAGAR, S. Resilience to the effects of social stress: Evidence from clinical and preclinical studies on the role of coping strategies. **Neurobiology of Stress**, v. 1, n. 1, p. 164, 2015.

WRAY, N. R. et al. Genome-wide association study of major depressive disorder: New results, meta-analysis, and lessons learned. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 1, p. 36–48, jan. 2012.

WURTMAN, R. J.; WURTMAN, J. J. Brain Serotonin, Carbohydrate-Craving, Obesity and Depression. **Obesity Research**, v. 3, n. S4, p. 477S-480S, 1 nov. 1995.

XIA, M. et al. The ameliorative effect of fluoxetine on neuroinflammation induced by sleep deprivation. **Journal of neurochemistry**, v. 146, n. 1, p. 63–75, 1 jul. 2017.

YANG, C. et al. R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. **Translational psychiatry**, v. 5, n. 9, 1 set. 2015a.

YANG, L. et al. The Effects of Psychological Stress on Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 4, 2015b.

YAU, Y. H. C.; POTENZA, M. N. Stress and Eating Behaviors. **Minerva endocrinologica**, v. 38, n. 3, p. 255, set. 2013.

YOUTH, R. A. et al. Ketamine anesthesia for rats. **Physiology & Behavior**, v. 10, n. 3, p. 633–636, 1 mar. 1973.

YU, Y. et al. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. **Brain Research**, v. 1194, p. 45–55, 15 fev. 2008.

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

ZARATE, C. A. et al. A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856–864, 1 ago. 2006.

ZELLER, E. A.; BARSKY, J. In vivo Inhibition of Liver and Brain Monoamine Oxidase by 1-Isonicotinyl-2-Isopropyl Hydrazine (19910). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 81, n. 2, 1952.

ZHANG, J. C.; LI, S. X.; HASHIMOTO, K. R. (-)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than S (+)-ketamine. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 116, p. 137–141, jan. 2014.

ZHENG, W. et al. Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated-dose intravenous ketamine for patients with unipolar and bipolar depression. **Journal of psychiatric research**, v. 106, p. 61–68, 1 nov. 2018.