



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**FRANCISCA TACIANA SOUSA RODRIGUES MAIA**

**DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DO  
APREPITANTE NO MODELO CRÔNICO DE DEPRESSÃO INDUZIDO PELA  
ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS.**

**FORTALEZA**

**2017**

FRANCISCA TACIANA SOUSA RODRIGUES MAIA

DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DO  
APREPITANTE NO MODELO CRÔNICO DE DEPRESSÃO INDUZIDO PELA  
ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS.

Tese submetida a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Danielle Macêdo Gaspar

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- MI86d Maia, Francisca Taciana Sousa Rodrigues.  
Determinação de alterações comportamentais e neuroquímicas do aprepitante no modelo crônico de depressão induzido pela administração repetida de lipopolissacarídeo em camundongos / Francisca Taciana Sousa Rodrigues Maia. – 2017.  
131 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.
1. Depressão. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Aprepitante. 4. Receptores NK1. I. Título.

CDD 615.1

---

FRANCISCA TACIANA SOUSA RODRIGUES MAIA

DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DO  
APREPITANTE NO MODELO CRÔNICO DE DEPRESSÃO INDUZIDO PELA  
ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS.

Tese submetida a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Danielle Macêdo Gaspar

Aprovada em: 24/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarissa Severino Gama  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Prof. Dr. Fábio Miyajima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo  
Universidade Federal do Ceará (UFC-Sobral)

A Deus.

Ao meu marido Rafael.

Aos meus pais Allan e Edvane.

Aos meus irmãos Tacielle, Allany e Samuel.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha base forte, meu consolo, meu abrigo. Tudo devo aquele que morreu para me dar a vida.

Ao meu amor, melhor amigo, companheiro e marido Rafael, por estar sempre ao meu lado, dispensando seu amor, carinho e compreensão. Mostrou-me de forma simples o que é o verdadeiro amor.

À minha mãe, minha fonte de inspiração, mulher de Deus, minha melhor amiga, meu exemplo de dedicação, faltam adjetivos pra descrever tudo o que você significa pra mim. Sou eternamente grata por tudo o que a senhora me ensinou e continua ensinando todos os dias. Obrigado, do fundo do coração, por sempre acreditar em mim, pelos conselhos e esse amor sem medidas

Ao meu pai, que sempre investiu e acreditou no meu potencial, torce muito por mim e vibra com as minhas conquistas.

Aos meus irmãos Tacielle, Allany e Samuel pelos momentos compartilhados de alegrias e “discussões” que nos fazem amadurecer e tornam nossa convivência fraternal.

À minha professora e orientadora Danielle Macedo, que em anos de convivência me fez perceber que a sabedoria e a simplicidade caminham juntas. Agradeço pelas conversas, orientações, ensinamentos e mais do que isso pela amizade. Meu muito obrigada!

Aos meus amigos docentes e decentes Eliclécio, Camila, Germana, Giovana, Greyce e Manoel pela convivência diária, pelos momentos de descontração e mais pela ajuda no trabalho árduo, sem o apoio de vocês esse trabalho teria sido ainda mais difícil.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Patrícia Xavier, Eduardo, Dayane e Vlândia pela amizade sincera e pelos momentos de troca de conhecimentos não só científicos mas para vida.

As minhas alunas e Içs Kelle, Kelmany e Carol pelo companheirismo e ajuda nos experimentos. Vocês foram essenciais para execução desse trabalho.

Ao Romário pelo compartilhar de conhecimentos, troca de experiências e pelas conversas despreziosas. Aprendi muito contigo.

Aos professores participantes da banca examinadora que dividiram comigo este momento tão importante e esperado: Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarissa Severino Gama, Prof. Dr. Fábio Miyajima, Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy e Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo.

Aos demais professores da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que tive a oportunidade de conhecer e absorver o conhecimento repassado.

Aos técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia: Vilani, e Lena, pela ajuda dada nos experimentos.

Às secretárias da Pós-graduação: Laura e Celia pela dedicação destinada a esta instituição e assim, sempre facilitando a vida dos alunos do Departamento de Pós-graduação em Farmacologia da UFC.

A CNPQ pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho encerramento de mais um ciclo em minha vida..

De modo geral, agradeço a todos que acreditam e torcem por mim. Guardo todos no meu coração. Gratidão!

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Façamos da interrupção um caminho novo, da queda, um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho, uma ponte, da procura, um encontro!”  
(Fernando Sabino).

## RESUMO

### **Determinação de alterações comportamentais e neuroquímicas do aprepitante no modelo crônico de depressão induzido pela administração repetida de lipopolissacarídeo em camundongos.**

A depressão é uma doença multifatorial caracterizada por um conjunto de sintomas psicológicos e físicos, associada a altos índices de comorbidades, incapacidade e mortalidade. Os fármacos disponíveis para o tratamento da depressão atuam através da regulação da via das monoaminas necessitando de pelo menos três semanas de administração para o início da ação antidepressiva. Evidências mostram o envolvimento de citocinas, através da ativação de vias imunológicas centrais e periféricas, e da translocação da microbiota devido ao aumento na permeabilidade intestinal na fisiopatologia da depressão. Baseado na hipótese das citocinas na depressão foi desenvolvido o modelo animal de depressão induzido pela administração repetida de lipopolissacarídeo (LPS). Por meio desse modelo, é possível determinar novos alvos terapêuticos para a depressão via regulação de mediadores imunoinflamatórios. O sistema Substância P e seu receptor NK1 estão envolvidos na regulação fisiológica da inflamação e do humor e seu antagonismo apresentou efeito antidepressivo em estudos clínicos e pré-clínicos. Nosso estudo avaliou os efeitos comportamentais e neuroquímicos de um antagonista de NK1, o aprepitante (APR), em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração intermitente de LPS. Para a indução da depressão, camundongos fêmeas Swiss receberam injeções intraperitoneais de LPS nas doses de 750, 1000 e 1250 µg/kg cinco dias por mês durante quatro meses. APR nas doses 4, 8 e 24 mg/kg, foi administrado 28 dias após o último desafio de LPS por 14 dias. Fluoxetina (FLU) 10 mg/kg foi usada como antidepressivo padrão. Os animais do grupo controle receberam salina 0,9% (SAL) por 14 dias. No décimo quarto dia, uma hora após o último tratamento, os comportamentos tipo-depressão foram avaliados. Vinte e quatro horas depois, a anedonia foi avaliada através do teste de preferência pela sacarose. Após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados e o córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram dissecados para realização dos testes neuroquímicos. Os resultados mostraram que o LPS induziu comportamentos depressivos. O tratamento com APR e FLU mostraram efeito antidepressivo (revertendo a anedonia e reduzindo o tempo de imobilidade no nado forçado) e atividade ansiolítica evidenciada no teste do campo aberto. As doses de APR 8 e 24 mg/kg apresentaram melhor atividade antidepressiva. Quanto aos parâmetros moleculares observou-se aumento na expressão de Iba1, de NFκB e dos níveis de IL1β no hipocampo. O aumento dos níveis de IL1β hipocampal relacionou-se com a redução da transcrição de RNAm de SAT1, dos níveis de BDNF e aumento da expressão de transcritos deIDO relacionado a diminuição nos níveis de triptofano, aumento de quinurenina e de ácido quinolínico. APR, na dose 24 mg/kg, reverteu as alterações comportamentais tipo depressão e anedonia induzidas pelo LPS por mecanismos relacionados a redução da ativação microglial e da expressão de NFκB, com conseqüente redução de citocinas inflamatórias como IFN-γ e TNF-α, redução de transcritos deIDO e aumento de RNAm de TDO e SAT1, acompanhados pela redução dos níveis de quinurenina e ácido quinolínico no hipocampo de camundongos. A FLU utilizada como antidepressivo padrão não reverteu a ativação microglial, neuroinflamação e a quantidade de transcritos de SAT1 desencadeados pelo LPS. Nesse contexto, os resultados demonstram que o bloqueio da via das taucinininas atenua alterações neuroinflamatórias, neurotróficas e genéticas desencadeadas pela administração repetida de LPS, demonstrando um relevante alvo terapêutico para o tratamento da depressão.

Palavras-chave: Depressão. Lipopolissacarídeo. Aprepitante. Receptores NK1.

## ABSTRACT

### **Determination of behavioural and neurochemical changes of the aprepitant in the chronic model of depression induced by repeated administration of lipopolysaccharide in mice.**

Depression is a multifactorial disease characterized by a set of psychological and physical symptoms associated with high rates of comorbidities, disability, and mortality. The drugs available for the treatment of depression act by controlling the levels of monoamines and require at least 3 weeks of administration for the initiation of antidepressant action. Recent evidence has showed the involvement of cytokines through activation of central and peripheral immunological pathways as well as the microbial translocation due to increased intestinal permeability (leaky gut) in the pathophysiology of depression. Based on the hypothesis of the cytokines in the depression it was developed the animal model of depression induced by the repeated administration of lipopolysaccharide (LPS). Through this model it is possible to determine new therapeutic targets for depression via regulation of immuno-inflammatory mediators. The system Substance P and its NK1 receptor is involved in the physiological regulation of inflammation and mood and its antagonism showed antidepressant phenotype in clinical and preclinical studies. Our study evaluated the behavioural and neurochemical effects of an antagonist of NK1, Aprepitant (Apr), in mice subjected to the model of depression induced by the intermittent administration of LPS. For the induction of depression, swiss female mice were injected with LPS intraperitoneally at the doses 750, 1000 and 1250 mg / kg 5 days a month for 4 months. Treatment with NK1 receptor (NK1R) antagonist, aprepitant (APR) at doses 4, 8 and 24 mg / kg, started 28 days after the last LPS challenge and lasted 14 days. Pharmacological validation was obtained with fluoxetine (FLU) 10 mg / kg. The control animals were treated with saline (SAL) 0.9% for 14 days. On the fourteenth day, one hour after the last treatment, the depression like behaviors was evaluated. Twenty-four hours later, anhedonia was evaluated using the sucrose preference test. After the last behavioral test the animals were euthanized and the prefrontal cortex, hippocampus and striatum were dissected for the neurochemical tests. The results showed that LPS induced depressive behavior. Treatment with APR and FLU showed antidepressant effect (reversing anhedonia and reducing the time of immobility in forced swimming) and anxiolytic activity evidenced in the open field test. Doses of APR 8 and 24 mg / kg showed better antidepressant activity. In the molecular parameters, we observed an increase in Iba1, NF $\kappa$ B and IL1 $\beta$  levels in the hippocampus. The increase in hippocampal IL1 $\beta$  levels was related to the reduction of SAT1 mRNA transcription, BDNF levels and increased IDO transcript expression related to decrease in tryptophan, kynurenine, and quinolinic acid levels. APR, at 24 mg / kg, reversed the behavioral changes induced by LPS through mechanisms related to the reduction of microglial activation and NF $\kappa$ B expression, with consequent reduction of inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , reduction of IDO transcripts and increase of TDO and SAT1 mRNA, accompanied by the reduction of the levels of kynurenine and quinolinic acid levels in the hippocampus of mice. The FLU used as the standard antidepressant did not reverse the microglial activation, neuroinflammation and the amount of SAT1 transcripts triggered by LPS. In this context, the results show that blockade of the tachykinin pathway attenuates neuro-inflammatory, neurotrophic and genetic alterations triggered by repeated administration of LPS demonstrating a relevant therapeutic target for the treatment of depression.

*Keywords:* Depression. Lipopolysaccharide. Aprepitant. NK1 receptors.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b> – Principais modelos animais de depressão .....	37
<b>Tabela 2</b> – Principais fármacos utilizados no tratamento da depressão .....	43
<b>Tabela 3</b> – Gradiente de fluxo para determinação simultânea de triptofano e seus metabólitos por HPLC.....	56
<b>Quadro 1</b> – Primers utilizados forward e reverse para análise de q-PCR.....	59
<b>Quadro 2</b> – Representação esquemática dos efeitos de APR4, APR8, APR 24 e FLU sobre os testes comportamentais. ....	111
<b>Quadro 3</b> – Representação esquemática dos efeitos de APR4, APR8, APR 24 e FLU sobre os testes biomoleculares e neuroquímicos.....	112

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fisiopatologia da depressão.....	24
Figura 2 – Ativação da via das quinureninas e sua consequência na neuroinflamação .....	32
Figura 3 – Via de metabolização do Triptofano .....	33
Figura 4 – Receptores de neurocininas e suas vias de ativação em regiões do cérebro de ratos .....	35
Figura 5 – Vias de ativação da neuroinflamação e suas consequências na depressão .....	41
Figura 6 – Fórmula estrutural plana da molécula do aprepitante.....	45
Figura 7 – Diagrama representativo do protocolo de tratamento.....	50
Figura 8 – Foto do aparato para realização do teste do campo aberto .....	52
Figura 9 – Desenho representativo do aparato para o teste do nado forçado.....	52
Figura 10 – Desenho representativo do teste de preferencia pela sacarose. ....	53
Figura 11 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) na atividade locomotora dos animais submetidos ao teste do campo aberto.....	62
Figura 12 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do campo aberto.....	63
Figura 13 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no tempo de permanência dos animais no quadrante central do campo aberto .....	64
Figura 14 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) na razão entre a atividade no quadrante central do aparato e a atividade em todos os quadrantes do teste do campo aberto.....	65
Figura 15 – Mapa do trajeto percorrido pelos animais no teste do campo aberto.....	66
Figura 16 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado .....	68
Figura 17 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) na preferência pelo consumo de sacarose.....	70
Figura 18 – Expressão proteica de Iba-1 por imunoblotting no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg).....	72
Figura 19 – Expressão proteica de NF-kB por imunoblotting no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg).....	73
Figura 20 – Alterações nas concentrações de IL4 induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no córtex pré-frontal de animais tratados com administração intermitente de LPS .....	74
Figura 21 – Alterações nas concentrações de IL4 induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS .....	76
Figura 22– Alterações nas concentrações de IL4 induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no corpo estriado de animais tratados com administração intermitente de LPS ..	77
Figura 23 – Alterações nas concentrações de IL1β induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no córtex pré-frontal de animais tratados com administração intermitente de LPS.....	79

Figura 24 – Alterações nas concentrações de IL1 $\beta$ induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	80
Figura 25 – Alterações nas concentrações de IL1 $\beta$ induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no corpo estriado de animais tratados com administração intermitente de LPS	81
Figura 26 – Alterações nas concentrações de BDNF induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no córtex pré-frontal de animais tratados com administração intermitente de LPS	83
Figura 27 – Alterações nas concentrações de BDNF induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	84
Figura 28 – Alterações nas concentrações de BDNF induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no corpo estriado de animais tratados com administração intermitente de LPS	85
Figura 29 – Alterações nas concentrações de IFN- $\gamma$ induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	87
Figura 30 – Alterações nas concentrações de TNF- $\alpha$ induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	88
Figura 31 – Expressão gênica de SAT-1 por qPCR no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)	90
Figura 32 – Expressão gênica deIDO-1 por qPCR no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)	91
Figura 33 – Expressão gênica de TDO-2 por qPCR no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)	92
Figura 34 – Alterações nas concentrações de triptofano (TRP) induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	94
Figura 35 – Alterações nas concentrações de serotonina (5HT) induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	95
Figura 36 – Alterações nas concentrações de quinurenina (QUI) induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	96
Figura 37 – Alterações nas concentrações de ácido quinolínico (AQ) induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS	97
Figura 38 – Mecanismo de ação do aprepitante na neuroinflamação	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

3HK – 3 Hidroxiquinurenina

5-HIAA – Ácido 5-hidroxiindolacético

5HT – Serotonina

5HT<sub>1A</sub> – Receptor de Serotonina do tipo 1A

5HT<sub>1B</sub> – Receptor de Serotonina do tipo 1B

5HT<sub>2c</sub> – Receptor de Serotonina do tipo 2C

AC – Adenilil Ciclase

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AMPC – Monofosfato cíclico de Adenosina

ANOVA – Análise de variância

APR – Aprepitante

AQ – Acido Quinolínico

ATC- Antidepressivos Triciclicos

ATV – Área Tegmental Ventral

BCL-2 – Família de proteínas denominadas Linfomas de Células B2

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BSA– Albumina sérica bovina

CA3 – Corno de Amon 3

cDna – Ácido desoxirribonucléico complementar

CD14- co- receptor *cluster of differentiation* 14

CE- Corpo estriado

CEPA – Comitê de Ética e Pesquisa Animal

CPF- córtex pré-frontal

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DA – Dopamina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E. coli- *Escherichia coli*

EPM– Erro padrão da média

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

ERN- Espécie Reativa de Nitrogênio

FLU – Fluoxetina

HC- Hipocampo

HHA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IgA- imunoglobulina A

IgM- imunoglobulina M

i.p – Intraperitoneal

Iba- 1- Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada

IDO- Idolamina 2,3 dioxigenase

IFN $\gamma$  – Interferon Gama

IL-2- Interleucina 2

IL-1 $\beta$ - Interleucina Beta

IL-6- Interleucina 6

IMAO- Inibidores da Monoaminoxidase

IMC – Imunidade Mediada por Células

ISRS – Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

KAT- Quinurenina Aminotransferase

KMO- Quinurenina-3- monoxigenase

LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano

MET – Aminoácido Metionina

MHFG –  $\alpha$ -metoxi-4-hidroxifenilglicol

MT1- receptor de melatonina 1

MT2- receptor de melatonina 2

NAc – Núcleo Accumbens

NE – Norepinefrina

NERT – Transportador de Norepinefrina

NF $\kappa$ B- Fator de transcrição nuclear-Kb

Nk1- Receptor de neurocinina 1

NKA- Neurocinina A

NKB- Neurocinina B

NMDA- N -metil D- aspartato

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMP- Padrão molecular associado ao patógeno

PF- pré- frontal

pmol- picomolar

PPL- Proteína ligante de LPS

QUI- Quinurenina

RG – Receptor de Glicocorticoide

RPM- rotação por minuto

SAL – Solução Salina (0,9% p/v)

SAT-1 - Espermidina/Espermina N- Acetiltransferase 1

SERT – Transportador de Serotonina

SMOX- espermina oxidase

SNC – Sistema Nervoso Central

TDO- Triptofano 2,3 dioxigenase

TGF $\beta$  – Fator de Crescimento Tumoral Beta

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

TRL- Receptores *Toll-like*

TRL 4- Receptores *Toll-like 4*

TRP- Triptofano

VAL – Aminoácido Valina

$\mu$ g – Micrograma

SP – Substância P

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Aspectos gerais da depressão .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Etiopatogenia da depressão.....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Hipótese monoaminérgica da depressão .....	25
1.2.2 Hipótese neurotrófica na depressão .....	26
1.2.3 Hipótese neuroendócrina na depressão.....	27
1.2.4 Hipótese glutamatérgica na depressão .....	28
1.2.5 Hipótese neuroinflamatória na depressão .....	29
<b>1.4 Neurocininas e seu papel na depressão .....</b>	<b>34</b>
<b>1.5 Modelos animais de depressão.....</b>	<b>35</b>
1.5.1 Modelo de depressão induzido por Lipopolissacarídeo .....	38
<b>1.6 Tratamentos Farmacológicos da Depressão .....</b>	<b>42</b>
1.6.1 Novos alvos para o tratamento da depressão .....	44
<b>1.7 Antagonistas dos receptores NK1.....</b>	<b>44</b>
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>46</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Gerais .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>48</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Animais .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Delineamento Experimental.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Testes Comportamentais .....</b>	<b>51</b>
4.3.1 Teste do campo aberto .....	51
4.3.2 Teste do nado forçado.....	52
4.3.3 Teste da preferência pela sacarose .....	53
<b>4.4 Testes Biomoleculares e Neuroquímicos.....</b>	<b>54</b>
4.4.1 Dosagem de BDNF e de citocinas ( <i>IL1<math>\beta</math></i> , <i>IL-4</i> , <i>TNF-<math>\alpha</math></i> e <i>INF-<math>\gamma</math></i> ) no cortex pré- frontal, hipocampo e corpo estriado por ensaio imunenzimatico (ELISA) .....	54
4.4.1.1 Técnica de ELISA.....	54

4.4.2	<i>Expressão proteica de NF-<math>\kappa</math>B e Iba-1 por Western Blotting</i>	54
4.4.2.1	Extração de proteínas	55
4.4.2.2	Método de Bradford para dosagem de proteína	55
4.4.2.3	Western Blotting	55
4.4.3	<i>Quantificações do Triptofano e seus metabólitos por HPLC</i>	56
4.4.4	<i>Investigação da Expressão Gênica de SAT 1, IDO 1 e TDO 2 por qPCR</i>	57
4.4.4.1	Preparação das amostras	57
4.4.4.2	Extração do RNA	57
4.4.4.3	Síntese do cDNA	58
4.4.4.4	PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	58
<b>5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>61</b>
6.1	<b>Teste do Campo aberto</b>	<b>61</b>
6.2	<b>Teste do nado forçado</b>	<b>67</b>
6.3	<b>Teste da preferência pela sacarose</b>	<b>69</b>
6.4	<b>Avaliações biomoleculares e neuroquímicas</b>	<b>71</b>
6.4.1	<i>Determinações da expressão proteica de Iba-1 e NF-<math>\kappa</math>B pela técnica de Western Blot</i>	71
6.4.2	<i>Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de IL4 em áreas cerebrais de camundongos</i>	74
6.4.3	<i>Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de IL1<math>\beta</math> em áreas cerebrais de camundongos</i>	78
6.4.4	<i>Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de BDNF em áreas cerebrais de camundongos</i>	82
6.4.5	<i>Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math> no hipocampo de camundongos</i>	86
6.4.6	<i>Determinações da expressão genica de SAT-1, IDO-1 e TDO-2 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	89
6.4.7	<i>Quantificações de Triptofano (TRP) e seus metabólitos por HPLC</i>	93
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>116</b>
	<b>APÊNDICE A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ</b>	<b>131</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da depressão

Os transtornos de humor podem ser unipolares ou bipolares, sendo a depressão unipolar o principal desses transtornos. A depressão foi descrita primeiramente por Hipócrates no século V a.C, segundo o qual o estado emocional do indivíduo dependia do equilíbrio entre quatro humores: sangue, fleuma, bile amarela e bile escura. Um excesso de bile escura causaria a depressão, o que explica o uso do termo *melancholia* (bile escura), na Grécia antiga, referindo-se à depressão (KANDEL et al., 2000).

Atualmente, entende-se que a depressão é uma doença multifatorial caracterizada por um conjunto de sintomas psicológicos e físicos, associada a altos índices de comorbidades, incapacitação e mortalidade, que atinge cerca de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (BROMET et al., 2011). A perda do prazer em realizar atividades normais da vida diária, sintoma conhecido como anedonia, juntamente com baixa autoestima, irritabilidade, sentimento de desesperança, inutilidade e culpa aparece entre os critérios para o diagnóstico da depressão. A coexistência de outras afecções psiquiátricas junto à depressão apresenta grande impacto na evolução da doença, resultando em recuperação tardia, aumento no risco de recaídas, incapacidades e tentativas de suicídio (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

A depressão também apresenta-se como fator de risco para o desenvolvimento de graves comorbidades clínicas, elevando os índices de incapacitação funcional nos pacientes. Diversos estudos relacionam a depressão ao desenvolvimento de doenças graves como epilepsia, diabetes, neoplasias, doença de Alzheimer, distúrbios cardiovasculares e transtornos de ansiedade (CARVALHO et al., 2014; HESDORFFER et al., 2000; NOUWEN; LLOYD; POUWER, 2009; PENNINX et al., 1998).

Segundo a organização mundial de saúde, o número estimado de pessoas com depressão aumentou em 18,4% entre os anos de 2005 a 2015, isso reflete o crescimento geral da população global, bem como um aumento proporcional nas faixas etárias em que a depressão é mais prevalente (WHO, 2015). Embora a ausência de informação direta sobre a prevalência da depressão na maioria dos países dificulte a realização de um panorama mundial preciso, dados epidemiológicos de estudos transnacionais mostram uma grande variabilidade nas taxas de prevalência (2.2% no Japão a 10.4%

no Brasil) e um risco de 2:1 para mulheres desenvolverem depressão em relação aos homens (BROMET et al., 2011).

Quando considerado um período de 12 meses seguidos, o Brasil lidera, entre os países em desenvolvimento, o ranking mundial de prevalência da depressão: 18% da população, em um estudo realizado pelo Instituto de Psiquiatria da Universidade de São Paulo que avaliou a prevalência de distúrbios psiquiátricos na região metropolitana da cidade, baseado em 5.037 entrevistas (PROJETO SÃO PAULO MEGACITY, 2012). Quanto ao estado do Ceará, tendo como base sua população no ano de 2007 (8.185.286 habitantes), um estudo epidemiológico apontou 15% de portadores de transtorno depressivo, sendo 50% portadores de transtorno recorrente e 33% portadores com evolução refratária (OLIVEIRA, 2010).

Infelizmente, não há um equilíbrio entre taxa de incidência e o acesso ao tratamento eficaz. Estima-se que menos da metade dos indivíduos afetados em todo o mundo (em alguns países, menos de 10%) recebam o tratamento. Algumas das barreiras encontradas são a ausência de recursos e profissionais de saúde capacitados, erros no diagnóstico e o estigma social enfrentado pelos portadores de desordens mentais (WORLD FEDERATION FOR MENTAL HEALTH, 2012).

Somado a esse quadro, sabe-se que os fármacos antidepressivos de primeira escolha para o tratamento (por exemplo, os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina - os ISRS) têm falhado em alcançar a remissão dos sintomas da doença em alguns pacientes (CONNOLLY; THASE, 2012; RUSH et al., 2006) e necessitam de pelo menos três semanas de administração para o início da atividade antidepressiva em grande proporção dos pacientes. Estima-se, ainda, que entre 30% a 40% dos pacientes não experimentam melhora significativa mesmo depois de um tratamento prolongado (MARKS; PAE; PATKAR, 2008), o que ativa a busca para novos fármacos no tratamento da depressão.

## **1.2 Etiopatogenia da depressão**

Diferentes estudos epidemiológicos demonstram um importante papel dos fatores ambientais, principalmente os eventos estressantes da vida, na etiologia da depressão (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011). Porém, por ser uma doença de natureza heterogênea, a depressão possui etiologia complexa e não completamente definida. Diversos modelos, relacionados tanto à psicologia cognitiva quanto às bases neurobiológicas sugerem mecanismos implicados, respectivamente, à psicopatologia e à fisiopatologia da depressão. E estudos aprofundados, tendo por base esses modelos,

revelam alterações funcionais em sistemas e regiões cerebrais específicos unindo os conhecimentos da psicologia aos da neurobiologia (BELZUNG; WILLNER; PHILIPPOT, 2015).

Entre as principais alterações neurológicas/neuroanatômicas, evidenciadas em humanos, possivelmente relacionadas à etiologia da depressão estão: a redução da proliferação celular no giro dentado hipocampal (GOULD et al., 2000), atrofia e perda de neurônios da região do Corno de Amon 3 (CA3) do hipocampo (MCEWEN, 2000), redução do volume do córtex pré-frontal subgenual e diminuição de neurônios e células gliais (DREVETS, 2000). Estudos de neuroimagem em cérebros de pacientes depressivos mostram, ainda, alterações estruturais e metabólicas em regiões do sistema cerebral de recompensa que fazem conexões monossinápticas diretas com o núcleo accumbens (NAc) e área tegmental ventral (ATV) (RUSSO; NESTLER, 2013).

Uma dificuldade em estabelecer a etiologia da depressão é que as alterações supracitadas podem ser resultantes de diversos fatores como a hiperativação do eixo Hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), excitotoxicidade glutamatérgica (TOKITA; YAMAJI; HASHIMOTO, 2012), infecção bacteriana ou viral com ativação de vias imunológicas e cascatas de inflamação (CANLI, 2014), encurtamento dos telômeros hipocampais (MAMDANI et al., 2015), hipóxia, isquemia ou vulnerabilidade ao estresse, entre outros (DUMAN et al., 2000).

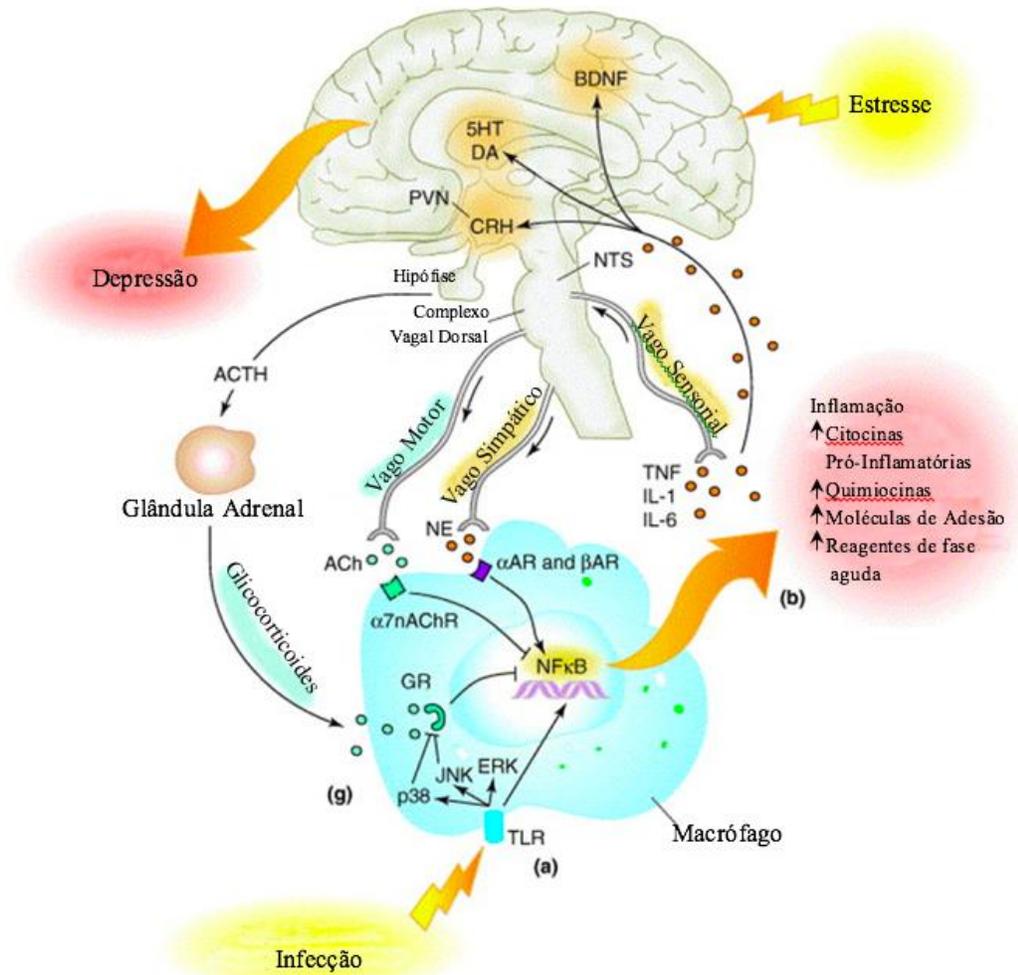
Diversos estudos apontam ainda para a importância da predisposição genética na etiologia da depressão e objetivam a caracterização de endofenótipos específicos da doença (HASLER et al., 2004). Não há um gene específico cuja expressão esteja relacionada ao início da depressão. Entretanto, ao interagir com fatores ambientais, genes de susceptibilidade causam modificações epigenéticas na molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA) e/ou possíveis mecanismos aleatórios, levando a comportamentos alterados que predisõem a transtornos mentais (GLAZIER; NADEAU; AITMAN, 2002; PETRONIS et al., 2003).

Um desses genes envolvidos nas alterações encontradas na depressão é o SAT-1 (Espermidina/Espermina N-Acetiltransferase 1). Estudos sugerem que a expressão reduzida desse gene está associada às alterações no metabolismo de poliaminas que contribuem para a fisiopatologia do transtorno depressivo maior e o comportamento suicida. A não ativação de SAT-1 (enzima limitante da velocidade na via catabólica do metabolismo das poliaminas) favorece o aumento nos níveis de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) que são importantes moduladores de estresse no sistema nervoso central (SNC) (KLEMPAN et al., 2009).

Dessa forma, fica evidenciada a complexidade da síndrome depressiva resultante de disfunções causadas por diversos eventos deflagradores em áreas específicas do cérebro como córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e gânglios basais relacionadas ao controle comportamental, cognitivo e aos sintomas somáticos observados na depressão.

O cérebro tende a permanecer em homeostase, entretanto diversos fatores podem causar desequilíbrio nos mecanismos compensatórios desse órgão, levando ao estabelecimento de transtornos neurocomportamentais como a depressão. A fisiopatologia da depressão (Figura 1) envolve fatores endógenos de predisposição e desregulação da resposta ao estresse. Diversas teorias, com intrínseca relação entre si, têm sido propostas para explicá-la (BELZUNG; WILLNER; PHILIPPOT, 2015).

**Figura 1 – Fisiopatologia da depressão**



Fonte: Modificado de KASALA, (2014). Diagrama esquemático que ilustra as vias envolvidas na fisiopatologia da depressão. Os estressores fisiológicos e físicos desencadeiam caminhos efetores, geralmente o eixo hipotálamo, hipófise, adrenal (HHA) e sistema imune. A ativação do eixo HHA leva à liberação de cortisol. A ativação do eixo HHA em conjunto com a via inflamatória leva à ativação de fatores de transcrição e consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas periféricas em associação com a rede central de citocinas contribuem para a fisiopatologia da depressão através da redução dos níveis de monoaminas, perda de plasticidade sináptica pela redução das neurotrofinas (BDNF). Esse processo destrutivo intensificado por mecanismos de proteção deficientes (antioxidantes e anti-inflamatórios) pode culminar no dano celular, apoptose e depressão.

### 1.2.1 Hipótese monoaminérgica da depressão

A teoria das monoaminas é a hipótese mais antiga para a fisiopatologia da depressão. Proposta na década de 1960, a partir da demonstração da restauração funcional da transmissão monoaminérgica no cérebro como mecanismo de ação dos fármacos antidepressivos (SCHILDKRAUT, 1967). Os sintomas depressivos seriam resultados de uma deficiência funcional na sinalização dos neurotransmissores monoaminérgicos.

Os sistemas monoaminérgicos são responsáveis pela regulação do humor, vigília, motivação, fadiga e padrões psicomotores. A ampla gama de funções dos neurônios serotoninérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos se devem as diversas áreas do cérebro aos quais estão projetados (STAHL; MUNTNER; GRADY, 2008).

Entre as evidências que fundamentam essa teoria, encontra-se a redução dos níveis de metabólitos das monoaminas no líquor, sangue e urina de pacientes deprimidos, a melhora na sinalização monoaminérgica com a utilização de fármacos antidepressivos efetivos e a indução de comportamentos semelhantes à depressão com o uso da reserpina, fármaco que causa depleção do armazenamento pré-sináptico de dopamina (DA), serotonina (5HT) e norepinefrina (NE) (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

Segundo essa teoria, as alterações funcionais, comportamentais, cognitivas e somáticas observadas na depressão são consequências de alterações na síntese, armazenamento e liberação de neurotransmissores, bem como do comprometimento da sensibilidade dos seus receptores e até mesmo das funções das moléculas de sinalização intracelular (BONDY, 2002). Estudos mais recentes mostram que na depressão unipolar há uma diminuição da síntese de 5HT e NE com redução de seus metabólitos ácido 5-hidroxicindolacético (5-AHIA) e  $\alpha$ -metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHFG), respectivamente (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

Entretanto, a depleção de monoaminas isoladamente não é suficiente para que se estabeleçam os sintomas característicos da síndrome depressiva (BONDY, 2002). Alterações funcionais das proteínas que atuam na recaptação dos neurotransmissores possuem importante papel na transmissão monoaminérgica, uma vez que elas reduzem a disponibilidade dos neurotransmissores nas fendas sinápticas cessando os efeitos das monoaminas nos seus receptores pré- e pós-sinápticos (BELZUNG; WILLNER; PHILIPPOT, 2015).

Os receptores de monoaminas, por sua vez, também desempenham importante papel na fisiopatologia da depressão. Alterações no acoplamento e na cascata de transdução de sinal também acarretam prejuízos à transmissão monoaminérgica (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009).

A diminuição da sensibilidade dos receptores pós-sinápticos de dopamina D2/D3, por exemplo, parece estar envolvida no comportamento de anedonia em pacientes depressivos. Esses receptores estão presentes em regiões do sistema límbico e o tratamento antidepressivo, em longo prazo, parece aumentar a sensibilidade desses receptores (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

Com o avanço da biologia molecular, os estudos têm focado seus esforços na determinação das cascatas de transdução de sinal. Pesquisas com células periféricas e em tecidos cerebrais *post-mortem*, mostraram alterações em proteínas G em diversos pontos da via do AMPc, bem como em proteínas quinases (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram a associação entre a atividade da adenilil ciclase (AC), principal enzima na síntese do AMPc, e comportamento suicida na depressão (REIACH et al., 1999). Além disso, fármacos antidepressivos, neurotransmissores e receptores serotoninérgicos agem mediante estimulação ou inibição da atividade catalítica da AC, afetando as concentrações de AMPc. Receptores 5HT<sub>1A/1B</sub> inibem a AC através do acoplamento com proteína G inibitória, enquanto os receptores 5HT<sub>7</sub> estimulam a AC através do acoplamento com proteína G estimulatória (BONDY, 2002; CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ; HOWELL; GOBBI, 2012).

A hipótese monoaminérgica da depressão, juntamente aos estudos das vias de transdução de sinais, nos mostra como a desregulação dos sistemas de neurotransmissores pode afetar áreas cerebrais importantes envolvidas na patogênese da depressão unipolar.

### **1.2.2 Hipótese neurotrófica na depressão**

A hipótese neurotrófica da depressão aponta o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) como a neurotrofina de maior importância na patogênese desse transtorno, uma vez que controla os eventos fisiológicos de neuroplasticidade, inibe as cascatas de morte celular e eleva as proteínas necessárias para a sobrevivência das células auxiliando na proliferação e manutenção dos neurônios do SNC (ADZIC et al., 2015; BONDY, 2002).

O pró-BDNF, peptídeo precursor, é convertido para BDNF por proteases intracelulares e extracelulares. O BDNF então se liga ao receptor TrkB, promovendo plasticidade neuronal, melhora na aprendizagem, e memória. Estudos sugerem que o pró-BDNF, até então conhecido como um

precursor inativo pode ligar-se ao receptor p75 induzindo apoptose neuronal (LU, 2003; DEINHARDT, 2014).

Evidência pré-clínica mostra redução nos níveis cerebrais de BDNF em animais com comportamentos depressão-símile (AONURM-HELM et al., 2015). Pesquisas clínicas e pré-clínicas também apontam que estresse e depressão levam a uma redução do volume hipocampal e morte celular no sistema límbico (AYDEMIR; DEVECI; TANELI, 2005; SHIMIZU et al., 2003). O comprometimento hipocampal na depressão está relacionado com ineficiência das cascatas de transdução de sinal dos fatores neurotróficos. A substituição do aminoácido valina (VAL) por metionina (MET) no códon 66, ou polimorfismo Val66Met, do BDNF modifica tanto sua classificação quanto sua disponibilidade na fenda sináptica e está relacionada também com a diminuição do volume do hipocampo (HARRISBERGER et al., 2015).

O mecanismo de morte celular proposto na depressão está relacionado com comprometimento dos mecanismos neurotróficos, elevação na neurotransmissão excitatória e supressão da neurogênese (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011). O tratamento antidepressivo tem-se mostrado capaz de elevar a neurogênese no hipocampo. Somando-se a isso, o BDNF tem sido apontado como um importante modulador dos efeitos comportamentais dos fármacos antidepressivos em modelos animais (BELZUNG; WILLNER; PHILIPPOT, 2015).

Entretanto, o BDNF parece gerar diferentes efeitos comportamentais a depender da área cerebral na qual se encontra aumentado, visto que sua elevação em áreas do sistema cerebral de recompensa está relacionada com comportamentos depressivos e sua administração na área tegumentar ventral (ATV) produz fenótipo semelhante à depressão (EISCH et al., 2003).

A hipótese neurotrófica da depressão tem possibilitado estudos mais aprofundados das vias de sinalização tanto do BDNF quanto de outros fatores neurotróficos, mostrando que muitas proteínas envolvidas nessas vias são reguladas por fármacos antidepressivos em modelos animais de depressão (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

### **1.2.3 Hipótese neuroendócrina na depressão**

A ativação do eixo Hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) possui importante influência na fisiopatologia da depressão. Essa via neuroendócrina é um componente essencial na capacidade humana em lidar com o estresse. O estímulo estressor leva o hipotálamo a liberar o hormônio

liberador de corticotrofina (CRH), que atua na hipófise estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea, com subsequente liberação de corticosteroide (principalmente cortisol em humanos) pela glândula adrenal (KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

O cortisol é o principal hormônio relacionado ao estresse e exerce suas funções basicamente via receptores: mineralocorticoides e glicocorticoides (RG), os últimos sendo expressos em áreas cerebrais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, que são relevantes nos processos cognitivos e estão relacionados à fisiopatologia da depressão (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

Em níveis elevados, os glicocorticoides podem causar danos ao hipocampo que dão início e mantém constante um estado de hipercotisolemia relacionado com alguns casos de depressão. O excesso de glicocorticoide causa ativação constante de seus receptores, o que pode reduzir a neurogênese no giro dentado hipocampal, dos dendritos apicais e provoca morte dos neurônios hipocampais. Em resumo, os glicocorticoides acionam mecanismos de morte neuronal via ativação de seus receptores, além de elevarem a suscetibilidade neuronal a diferentes toxinas como espécies reativas de oxigênio (ERO) e excitotoxinas. Juntos, todos esses fatores contribuem para a redução do volume hipocampal encontrado na depressão (ADZIC et al., 2015; LANG; BORGWARDT, 2013).

Existe ainda forte evidência de que as respostas ao estresse mediadas pelo eixo HHA são impulsionadas pela liberação do neurotransmissor glutamato no núcleo paraventricular hipotalâmico. A inervação glutamatérgica sofre alterações de neuroplasticidade quando o organismo encontra-se em estresse crônico, podendo estar envolvida na sensibilização das respostas do eixo HHA (EVANSON; HERMAN, 2015).

#### **1.2.4 Hipótese glutamatérgica na depressão**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC dos mamíferos e seus efeitos são mediados por uma grande variedade de receptores ionotrópicos e metabotrópicos expressos amplamente no SNC. A desregulação da transmissão glutamatérgica é um fator essencial no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos (WERNER J. SCHMIDT; MAARTEN E. A. REITH, 2005). Estudos com espectroscopia por ressonância magnética mostraram alterações no metabolismo do glutamato em áreas específicas relacionadas aos transtornos de humor (TOKITA; YAMAJI; HASHIMOTO, 2012).

Efeitos citotóxicos decorrentes da ativação do receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) pelo ácido quinolínico (agonista endógeno do receptor NMDA) estão relacionados à morte celular e a comportamentos depressão-símile em roedores (CAMPBELL et al., 2014; DANTZER et

al., 2008). A hiperestimulação de receptores NMDA pode resultar em atrofia hipocampal com subsequente perda de receptores de glicocorticoides, levando a uma ineficiência da regulação negativa do eixo HHA, e estimulação excessiva desse eixo. Elevando os níveis de cortisol, quadro característico em modelos animais de depressão (ALLISON; DITOR, 2014).

A modulação da liberação de glutamato ou o antagonismo de seu receptor podem ser boas ferramentas para o tratamento da depressão. De fato, estudos pré-clínicos mostram efeito antidepressivo da cetamina, um bloqueador do receptor NMDA (TOKITA; YAMAJI; HASHIMOTO, 2012).

### **1.2.5 Hipótese neuroinflamatória na depressão**

As citocinas são moléculas proteicas ou glicoproteicas variando entre 6 e 70 kDa, que podem ser produzidas por células do sistema imune ou células endoteliais e epiteliais da mucosa. Possuem a função de regular a duração e intensidade de respostas específicas, bem como recrutar células efetoras para as áreas responsáveis e induzir a geração e maturação de novas células a partir de precursores. Podem atuar sobre a própria célula que as produz (função autócrina), sobre uma célula próxima (função parácrina) ou agir como hormônios, atuando em órgãos distantes (função endócrina).

O sistema imune mantém sob vigilância os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, objetivando um equilíbrio e facilitando a sinalização para o cérebro quando ocorrem estímulos inflamatórios periféricos. A nível periférico, a ativação de neutrófilos e macrófagos por patógenos imunogênicos ocasiona a liberação de citocinas pró-inflamatórias que sinalizam para células da micróglia no sistema imune central. A resposta ao estímulo periférico então se dá através da modulação positiva de proteínas pró-inflamatórias, receptores, e hormônios no SNC (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015). Acredita-se que um desequilíbrio nesse sistema leve às alterações bioquímicas, cognitivas e estruturais associadas com o desenvolvimento da depressão (YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014).

O SNC está em constante vigilância imunológica que acontece nos compartimentos meníngeos, entretanto os mecanismos de entrada e saída de células do sistema imune do SNC ainda não estão completamente esclarecidos (LOUVEAU et al., 2015). Foram descritas pelo menos cinco vias de acesso para a sinalização de citocinas ao SNC: 1) passagem através de regiões permeáveis da barreira hemato-encefálica como os órgãos circumventriculares; 2) transporte ativo por transportadores saturáveis; 3) ativação de células que revestem a vasculatura cerebral (por exemplo,

células endoteliais e macrófagos perivasculares), que liberam citocinas e outros mediadores inflamatórios no parênquima cerebral; 4) ligação aos receptores de citocinas associados a fibras nervosas aferentes periféricas (por exemplo, nervo vago); 5) e o recrutamento de células ativadas, como os macrófagos, da periferia para o cérebro (HAROON; RAISON; MILLER, 2012).

A participação de citocinas na patogênese da depressão foi relatada a partir de achados clínicos e experimentais (DUNN; SWIERGIEL; DE BEAUREPAIRE, 2005; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Na clínica, foi visto que pacientes tratados com Interferon (IFN) e Interleucina 2 (IL-2) desenvolvem sintomas relacionados aos da gripe, além de sintomas que se assemelham aos vistos na depressão. As alterações imunológicas em pacientes depressivos observadas na clínica são citadas há mais de 30 anos (BONDY, 2002; CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011).

Estudos mais recentes relatam elevação nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) em pacientes com neurodegeneração e sintomas como anedonia, humor deprimido, fadiga e letargia, todos característicos de depressão (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015; DANTZER et al., 2008). Além disso, também foi relatada elevação nos níveis dessas citocinas em amostras de pacientes que cometeram suicídio e com ideação suicida, mostrando que as citocinas podem desempenhar papel fundamental nos diferentes tipos de depressão (YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014).

A intensa ativação de vias imunológicas e inflamatórias leva a um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e defesas antioxidantes em pacientes depressivos, causando danos a macromoléculas como o DNA, em ácidos graxos, proteínas e mitocôndria, formando neoepitopos imunogênicos (KUBERA et al., 2011; LEONARD; MAES, 2012). A permanência desse quadro está relacionada a episódios depressivos prolongados com menor intervalo de tempo entre eles, além de declínio cognitivo e modificações neuroanatômicas (DUMAN et al., 2000).

A exposição crônica ao estresse, com disfunção do eixo HHA, promove alterações no equilíbrio da microbiota e interrompe a barreira intestinal, aumentando os níveis circulantes de componentes da parede celular bacteriana imunomoduladora, como o lipopolissacarídeo (SANTOS, et al. 2001; SODERHOLM e PERDUE, 2001). Estudos em humanos também mostram aumento da translocação bacteriana em distúrbios psiquiátricos relacionados ao estresse, como a depressão (MAES, et al., 2012; OGBONNAYA, et al., 2015; JIANG, et al., 2015)

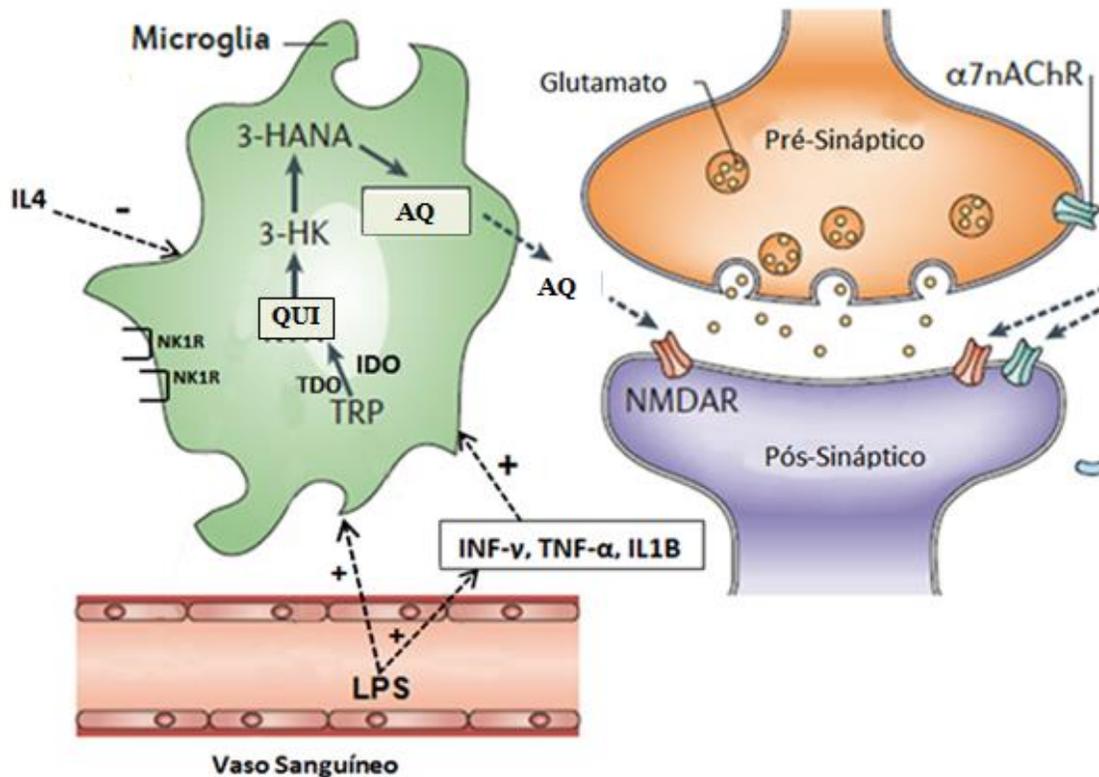
Após a translocação bacteriana, citocinas periféricas são produzidas em resposta ao reconhecimento do padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) por receptores *Toll-like* (TLR) nas células fagocíticas. O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs induz a formação de citocinas como IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que por sua vez irão estimular a produção ou potencializar a ação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ , produzidas por células apresentadoras de antígenos (YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014).

Ainda não se sabe como as citocinas e o estresse oxidativo induzem o comportamento depressivo. Uma das principais hipóteses postula que as citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , induzem a ativação da enzima indoleamina 2,3-desoxigenase (IDO) (Figura 2) em células da micróglia, astrócitos, neurônios, células dendríticas e macrófagos. Essa enzima converte o aminoácido precursor da serotonina, triptofano, em quinurenina, que é transformada em seus metabólitos neuroativos os ácidos quinurênico e quinolínico (Figura 3) (STONE; DARLINGTON, 2013).

O ácido quinolínico se liga ao receptor NMDA, aumentando a atividade glutamatérgica, cuja elevação relaciona-se também ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Além disso, a ativação da IDO leva à diminuição dos níveis de serotonina, evidenciando a interferência das citocinas na neurotransmissão monoaminérgica (HAROON; RAISON; MILLER, 2012). Diversos estudos com animais apoiam a associação entre inflamação, elevação de citocinas pró-inflamatórias, depleção de monoaminas, comportamentos depressivos e redução do volume hipocampal (ADZIC et al., 2015).

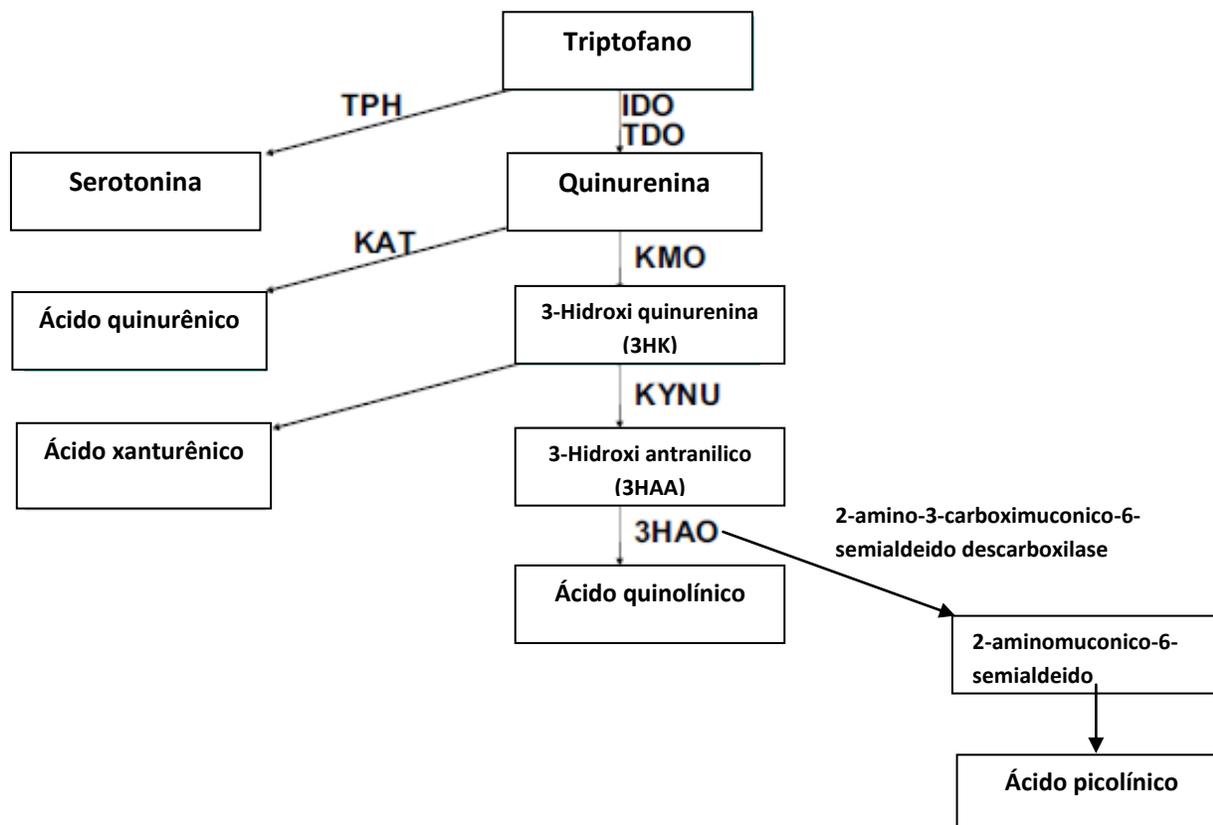
Estudos mostram que as citocinas pró-inflamatórias e a hiperestimulação do receptor NMDA afetam o eixo HHA, promovendo febre, diminuição do apetite e liberação em excesso do hormônio liberador de corticotrofina, comprometendo a regulação negativa do eixo HHA e gerando resistência aos glicocorticoides no sistema imune (ADZIC et al., 2015; DUMAN, 2002; LANG; BORGWARDT, 2013). Diante dos achados, tornou-se necessário o entendimento das alterações imunes na fisiopatologia da depressão e a pesquisa de drogas anti-inflamatórias que possam reverter o fenótipo depressivo.

Figura 2 – Ativação da via das quinureninas e sua consequência na neuroinflamação



Fonte: Modificado de SCHWARCZ (2012). No cérebro de mamíferos, as enzimas da via das quinureninas, são preferencialmente, localizadas em células não neuronais. A ativação da via inflamatória pela translocação de lipopolissacarídeo (LPS) ativa citocinas pró- inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , que ativam o metabolismo da via pela enzima indoleammina 2,3-desoxigenase (IDO), convertendo triptofano (TRP) em quinurenina (QUI), 3-hidroxiquinurenina (3-HK), ou por metabólitos formados localmente. 3-HK e os seus principais metabólitos são sintetizados na micróglia e em outras células de origem monocítica. Uma vez sintetizado dentro das células gliais, o ácido quinolínico (AQ) é prontamente liberado no meio extracelular para afetar seus alvos neuronais pré e pós-sinápticos. A ligação do AQ em receptores NMDA pode causar danos neuronais por disfunção mitocondrial ou pela formação de radicais livres.

Figura 3 – Via de metabolização do Triptofano



Fonte: Modificado de PENG YU (2016). Um resumo dos principais componentes da via de metabolização do Triptofano. IDO - Indoleamina 2,3-desoxigenase; TDO- Triptofanon 2,3 desoxigenase ; KMO- Quinurenina 3 monooxigenase; 3-HAO- 3 HAA oxigenasse; KYNU – Quinureninase; KAT- Quinurenina aminotransferase; TPH- Triptofano hidroxilase.

#### 1.4 Neurocininas e seu papel na depressão

As taquicininas representam a principal família de peptídeos envolvidos na neurotransmissão e em processos inflamatórios. Nos mamíferos, destacam-se como principais membros dessa família a Substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB). Os receptores de taquicininas são receptores acoplados à proteína G e estão divididos em três subtipos: receptor NK1, cujo ligante de maior afinidade é a SP; receptor NK2 como ligante preferencial a neurocinina A e o receptor NK3 cujo ligante de maior afinidade é a neurocinina B (STEINHOFF et al., 2014).

As taquicininas não atuam exclusivamente como neuropeptídios. Sabe-se que a SP, por exemplo, está relacionada a processos fisiológicos como hematopoese, cicatrização, permeabilidade vascular, neuroinflamação, circulação leucocitária, sobrevivência celular e disseminação metastática de tumores (CONNOLLY; THASE, 2012).

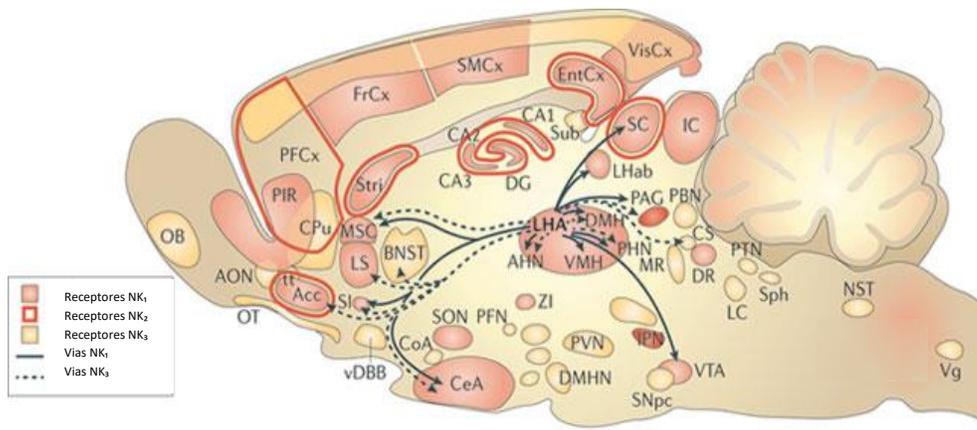
O receptor NK1 pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G rodopsina-símile. Sua estimulação conduz a ativação de pelo menos três vias de sinalização por segundos mensageiros: fosfatidil inositol, com elevação de cálcio intracelular; a do ácido araquidônico com formação de prostanoídes; e a do AMP cíclico (P.L.R. ANDREWS, S. BOYCE, S.D. BRAIN et al., 2004). Esse receptor está relacionado a respostas celulares como a transmissão da dor, secreção endócrina e parácrina e modulação da diferenciação celular, além de atuar como neuromodulador, contribuindo para a homeostase cerebral e transmissão sensorial na depressão, ansiedade, estresse e êmese (YAN; HUNT; STANFORD, 2009). O receptor NK1 também modula a resposta inflamatória via sistema imunológico, sendo expresso em linfócitos, monócitos, macrófagos, linfócitos *natural killers* e células da micróglia (STEINHOFF et al., 2014).

Assim como os receptores NK1, os neurônios que produzem SP estão amplamente expressos no sistema límbico, em regiões envolvidas na fisiopatologia da depressão como amígdala, hipotálamo e hipocampo (Figura 4). Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado o papel do sistema SP/NK1R na regulação do estresse e da emoção e, conseqüentemente, na patogênese dos transtornos depressivos (ROCHE et al., 2012).

Em condições de estresse e ansiedade, neuropeptídios como a SP são liberados proporcionalmente à frequência e intensidade do estímulo. Diversos estudos mostram que a interação entre SP e o receptor NK1 desempenha papel fundamental no controle do comportamento emocional

(YAN; HUNT; STANFORD, 2009). Já o antagonismo farmacológico ou genético do receptor NK1 reduz as alterações comportamentais induzidas por estresse em modelos animais de depressão (LELAS et al., 2013).

**Figura 4 – Receptores de neurocininas e suas vias de ativação em regiões do cérebro de ratos**



Fonte: Modificado de GRIEBEL e HOLSBOER (2012). A figura mostra os receptores de neurocininas (NK1, NK2 e NK3) em diversas regiões do cérebro de ratos bem como suas vias de ativação. Acc, núcleo accumbens; AHA, área hipotalâmica anterior; AHN, núcleo hipotalâmico anterior; Amy, amígdala;; BasF, prosencéfalo basal; BG, gânglios basais; BLA, amígdala basolateral; CA1, campo de hipocampo CA1; CC, corpo caloso; CeA, amígdala central; CG, matéria cinzenta central; Cincx, córtex cingulado; CoA, núcleo amígdaloide cortical; CPu, caudado putame; CS, núcleo central superior raphe; DBB, banda diagonal de Broca; DG, giro dentado; DMH, hipotálamo dorsomedial; DMHN, núcleo hipotalâmico dorsomedial; DR, rafe dorsal; DVC, núcleo motor dorsal do vago; FrCx, córtex frontal; Hyp, núcleo hipotalâmico; LC, locus cerulus; LDT, núcleo tegmental laterodorsal; LH, hipotálamo lateral; LHA, área lateral do hipotálamo; LS, septo lateral; MeA, amígdala mediana; MFB, feixe mediano do prosencéfalo; MMN,; PeN, núcleo hipotalâmico periventricular; PFCx, córtex pré-frontal; PFN, núcleo talâmico parafascicular; PHN, núcleo hipotalâmico posterior; PIR, área piriforme; Pit, pituitária anterior;; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; Sub, subiculum; SC, colículo superior; Vg, nervo vago; VisCx, córtex visual; VMH, núcleo ventromedial hipotálamo; VP, palidum ventral; VTA, área tegmental ventral; ZI, zona inserta.

### 1.5 Modelos animais de depressão

Os modelos animais para estudos experimentais são ferramentas de grande valia para a compreensão da fisiopatologia da depressão e para a avaliação inicial de novos fármacos, além de possibilitar a determinação dos possíveis mecanismos neurobiológicos associados à ação desses

fármacos. O desenvolvimento de tais modelos é desafiador em virtude da difícil correlação entre comportamentos avaliados em animais e os observados em seres humanos (NESTLER; HYMAN, 2010).

Muitos dos sintomas utilizados para estabelecer diagnóstico de depressão em humanos, como tristeza, sentimento de culpa e ideação suicida, não podem ser avaliados em animais de maneira convincente. Entretanto a depressão, assim como outros transtornos psiquiátricos, possui endofenótipos, como alterações fisiológicas, endócrinas e neuroanatômicas, além de características comportamentais que podem ser reproduzidas e avaliadas em animais (DEUSSING, 2006; NESTLER; HYMAN, 2010).

Para comprovar a eficiência do modelo animal em representar a doença em estudo, é necessário que as mudanças comportamentais possam ser monitoradas objetivamente e revertidas pelo tratamento com eficácia já comprovada em humanos, conferindo ao modelo validade preditiva. Deve ainda apresentar sintomatologia análoga à doença em humanos, o que caracteriza uma validade de face e adicionalmente ele precisa ser reprodutível entre laboratórios (CHADMAN; YANG; CRAWLEY, 2009).

Embora haja distinções entre as formas de indução de depressão ou sintomas semelhantes à depressão no animal, os modelos atualmente em uso (Tabela 1) precisam apresentar os critérios de validação supracitados de modo a assegurar um resultado confiável.

Tabela 1 – Os principais modelos animais de depressão

<b>Modelo</b>	<b>Comentários</b>	<b>Referências</b>
<b>Estresse da vida adulta</b>		
Desamparo aprendido	Sensível apenas a alguns antidepressivos e ao tratamento agudo Possui restrições éticas	(SELIGMAN; ROSELLINI; KOZAK, 1975)
Estresse crônico leve	Baixa reprodutibilidade Demanda mais tempo para indução Apenas alguns antidepressivos são efetivos	(WILLNER, 2005)
Estresse social	Baixa reprodutibilidade Demanda mais tempo para indução Apenas alguns antidepressivos são efetivos	( <i>Continua</i> ) (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001)
<b>Estresse no início da vida</b>		
Separação maternal	Os efeitos dos antidepressivos nesse modelo são incertos	(HOLMES et al., 2005)
<b>Lesões</b>		
Bulbectomia olfatória	Método Invasivo Mecanismo de ação incerto Sensível ao tratamento crônico	(SONG; LEONARD, 2005)
<b>Farmacológico</b>		
Reserpina	Sensível aos antidepressivos Efeito na redução do humor ainda não está esclarecido Não seletivo para todas as monoaminas	(NUTT, 2006)
Triptofano	Sensível aos antidepressivos Não reproduz sinais e sintomas de depressão	(NUTT, 2006)
Retirada de psicoestimulantes	Induz sintomas depressão-símile Sensível aos antidepressivos Sintomas são transientes, durando cerca de uma semana Necessita de validação	(BARR; MARKOU, 2005)

---

Corticosterona	Fácil reprodutibilidade Possui validade preditiva e de face Reproduz sinais e sintomas da depressão Sensível ao tratamento crônico	(STERNER; KALYNCHUK, 2010)
<b>Genético</b>		
Camundongos geneticamente Modificados	Permite estudo de um único gene Verifica interações de endofenótipos Não mimetiza doenças com origens multigênicas	(URANI; CHOURBAJI; GASS, 2005)
Reprodução seletiva	Identifica diferenças individuais na suscetibilidade à depressão Permite estudo de doenças com origens multigênicas Necessita de validação	(EL YACOUBI et al., 2003)

---

Fonte: Modificado de DEUSSING, 2006.

### 1.5.1 Modelo de depressão induzido por Lipopolissacarídeo

Lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na membrana externa da parede celular de diversas bactérias Gram-negativas. A molécula consiste em um domínio hidrofóbico, conhecido como lipídeo A, uma sequência de oligossacarídeo e um polissacarídeo (ou antígeno O) em sua porção distal. A porção hidrofóbica do LPS, ou lipídeo A, é bastante imunogênica e, devido a sua estrutura bem conservada, pode ser reconhecida em concentrações da ordem de picomolar (pmol) pelo sistema imune inato via complexo de reconhecimento formado pela proteína ligante de LPS (PLL), pelo co-receptor *cluster of differentiation* 14 (CD14) e pelo receptor *Toll-like 4* (TLR4), presentes na membrana plasmática das células eucarióticas sobre tudo em macrófagos, células endoteliais, além de neurônios e astrócitos (RAETZ; CHRIS WHITFIELD, 2002).

A ativação do TLR4 pelo lipídeo A dispara a biossíntese de diversos mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  principalmente via ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, além de induzir a síntese de moléculas co-estimulatórias necessárias para a resposta imune adaptativa (RAETZ; CHRIS WHITFIELD, 2002).

Diversos estudos em modelos animais mostram que o desafio com o lipídeo A sintético, baseado no LPS da *Escherichia coli* (E.coli) causa o mesmo espectro de ações inflamatórias de uma infecção externa por patógenos que expressam o LPS (ADZIC et al., 2015; FERREIRA MELLO et

al., 2013). O conhecimento atual sobre a interação entre LPS e TLR4 e sua subsequente cascata de sinalização intracelular levando à inflamação é uma estratégia de grande valia para o estudo e o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de patologias com base inflamatória como a depressão (RAETZ; CHRIS WHITFIELD, 2002).

Evidências recentes mostram que a depressão crônica é acompanhada por elevação nos títulos de anticorpos Imunoglobulina M (IgM) e IgA contra LPS de bactérias Gram negativas comensais do trato gastrointestinal humano. Isso indica que essas bactérias comensais teriam se deslocado para os linfonodos mesentéricos ou para a corrente sanguínea, e como resposta a essa ação, o sistema imunológico seria ativado, reconhecendo esse LPS e montando uma resposta imune-humoral contra o mesmo (CORONA et al., 2013; MAES et al., 2012, 2013).

A translocação da microbiota intestinal devido ao aumento da permeabilidade intestinal em resposta ao estresse pode ser o mecanismo responsável pelo quadro de constante ativação de vias inflamatórias, da imunidade mediada por células, além de danos causados por estresse oxidativo e nitrosativo e das respostas autoimunes vistas na depressão (Figura 5) (MAES et al., 2012, 2013).

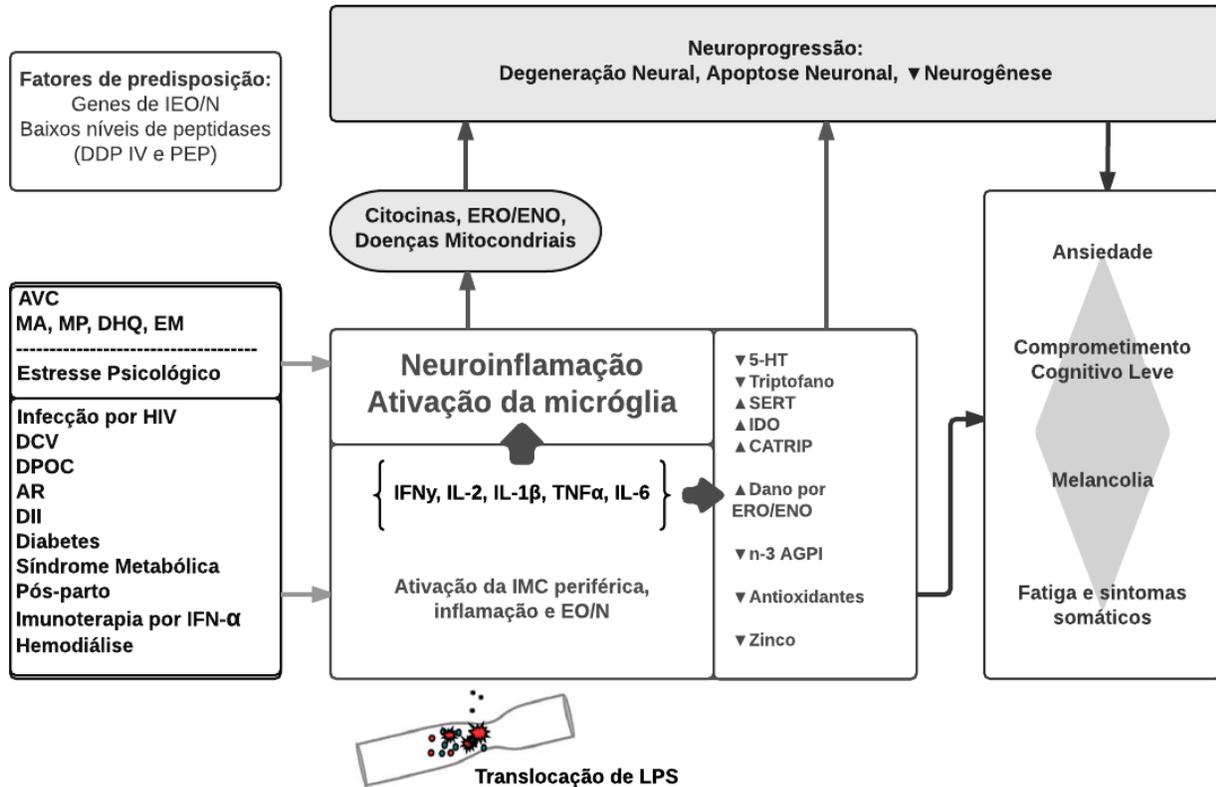
Nosso intestino é colonizado por, aproximadamente, 600 tipos diferentes de bactérias comensais e algumas delas são tóxicas, possuindo LPS (endotoxina). Além disso, sob estímulo do cortisol e/ou noradrenalina (liberados no estresse) essas bactérias gram negativas proliferam. O aumento da permeabilidade intestinal favorece a translocação bacteriana, de modo que o LPS interage com o TLR4, ativando a via do fator transcricional NF- $\kappa$ B e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias tanto periférica quanto central. O processo inflamatório conduz à neuroprogressão (neurodegeneração, redução da neurogênese e elevação da apoptose), contribuindo para o estabelecimento e cronicidade da depressão (MAES et al., 2012).

Além de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, o LPS é capaz de ativar a enzima IDO e essa ativação leva à depleção dos níveis de serotonina e a formação do ácido quinolínico (agonista do receptor NMDA) contribuindo para as alterações bioquímicas, cognitivas e neuroanatômicas da depressão (FATOKUN; HUNT; BALL, 2013; STONE; DARLINGTON, 2013).

A partir dessas constatações, foi proposto um novo modelo animal de depressão crônica, a partir do desafio com LPS via intraperitoneal (i.p) por 5 dias ao mês durante quatro meses, induzindo

um quadro de neuroinflamação crônica, alterações comportamentais e neuroquímicas condizentes com endofenótipos depressivos, como anedonia e redução de BDNF, e com validade preditiva testada pela administração de um inibidor seletivo de recaptação de serotonina (fluoxetina) capaz de reverter os endofenótipos depressivos (KUBERA et al., 2013a). Este modelo se mostra, portanto, um modelo com elevada confiabilidade além de ser útil para pesquisas de fármacos com atividade anti-inflamatória e possível ação antidepressiva, utilizando uma nova abordagem no tratamento da depressão.

**Figura 5 – Vias de ativação da neuroinflamação e suas consequências na depressão**



Fonte: Modificado de MAES (2011). Relação entre ativação imune mediada por células (IMC), caracterizada por elevação de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina-2 (IL-2); Inflamação, caracterizada por produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6; e as vias de estresse oxidativo e nitrosativo (EO/N). As vias demonstradas acima estão relacionadas com neuroinflamação e ativação microglial. As consequências, em longo prazo, da ativação periférica e central das vias de EO/N são elevação do dano por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) ao DNA, proteínas, ácidos graxos, redução dos antioxidantes zinco e ômega-3-ácido graxo poli-insaturados e disfunções mitocondriais que ocorrem tanto na periferia quanto no cérebro. Demais consequências são aumento da expressão do receptor de 5HT e ativação da IDO, elevando o catabolismo do triptofano (CATRIP). Também são fatores relacionados ao desenvolvimento da depressão, com neuroinflamação e ativação da IMC: doenças cardiovasculares (DCV), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), artrite reumatóide (AR), lupus eritematoso sistêmico (LES), doença inflamatória intestinal (DII), infecção pelo vírus HIV, diabetes, síndrome metabólica, Mal de Alzheimer (MA), doença de Huntington (DH), Mal de Parkinson (MP), esclerose múltipla (EM), acidente vascular cerebral (AVC), o período pós-parto, hemodiálise, terapia com INF- $\gamma$ , fatores estressores psicológicos, redução da atividade das peptidases dipeptidil peptidase IV (DPP IV) e prolil-endopeptidase (PEP) devido a polimorfismos genéticos.

## 1.6 Tratamentos Farmacológicos da Depressão

A psicofarmacologia teve seu início de maneira empírica. A iproniazida, por exemplo (fármaco inibidor da enzima monoaminoxidase), foi introduzida no tratamento da depressão a partir da observação da elevação do humor e euforia em pacientes tratados para a tuberculose com a medicação. Logo após a inclusão da iproniazida no tratamento da depressão, pesquisas sobre compostos anti-histamínicos levaram ao surgimento da imipramina, sendo o primeiro fármaco de uma série de antidepressivos tricíclicos (BERTON; NESTLER, 2006).

As pesquisas para o desenvolvimento de fármacos antidepressivos sofreram significativo avanço após a introdução da reserpina no início da década de 1950. Por meio da compreensão do seu mecanismo de ação, que consiste na inibição do armazenamento neuronal de aminas biogênicas como serotonina e norepinefrina, a indústria começou a desenvolver fármacos que aumentam a função dessas aminas em áreas sinápticas específicas envolvidas na depressão, obtendo resultados positivos, como os antidepressivos tricíclicos (ATC) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAO) (BERTON; NESTLER, 2006). Entretanto, apesar de serem eficientes no tratamento da depressão, esses fármacos apresentam um período de latência, cerca de quatro semanas, até que seus efeitos sejam observados na clínica. As respostas compensatórias lentas ao bloqueio inicial da recaptura de aminas pode explicar, em parte, esse período de latência (VON WOLFF et al., 2013).

Os antidepressivos atualmente disponíveis (Tabela 2), são classificados de acordo com suas ações primárias sobre o metabolismo, recaptura ou o antagonismo seletivo dos receptores de serotonina, norepinefrina ou ambas (RUSH et al., 2006; VON WOLFF et al., 2013).

Uma limitação da terapia antidepressiva é que os fármacos antidepressivos proporcionam uma completa remissão para apenas cerca de 50% dos indivíduos diagnosticados como deprimidos, além de causarem efeitos colaterais de intensidade variável, que eventualmente levam ao abandono do tratamento (BENTLEY; PAGALILAUAN; SIMPSON, 2014).

As principais classes de antidepressivos são: antidepressivos tricíclicos, tetracíclicos, inibidores da recaptura da serotonina e noradrenalina, inibidores da monoaminoxidase (IMAO) e inibidor seletivo da recaptura de serotonina (SSRI) (BENTLEY; PAGALILAUAN; SIMPSON, 2014; CONNOLLY; THASE, 2012; THASE; DENKO, 2008). A exceção à classificação dos antidepressivos de acordo com sua ação sobre a serotonina e a norepinefrina é a bupropiona, que atua

regulando a transmissão dopaminérgica mesocorticolímbica (MARKS; PAE; PATKAR, 2008; WERNER J. SCHMIDT; MAARTEN E. A. REITH, 2005).

**Tabela 2 – Principais fármacos utilizados no tratamento da depressão**

	<b>Drogas</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
<b>Inibidores da recaptação seletivos de serotonina</b>	Citalopram, Escitalopram, Fluoxetina, Sertralina	Inibe seletivamente a recaptação de serotonina
<b>Antidepressivos tricíclicos</b>	Amitriptilina, Imipramina, Desipramine, Doxepin	Inibidores não seletivos da recaptação de monoaminas, incluindo serotonina, dopamina e norepinefrina
<b>Inibidores da recaptação de norepinefrina e dopamina</b>	Bupropiona	Inibe a recaptação de norepinefrina e dopamina
<b>Modulador de Serotonina</b>	Nefazadone, Trazodone	Antagonistas de receptores 5-HT <sub>2</sub>
<b>Inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina</b>	Desvenlafaxina , Venlafaxina , Duloxetine	Inibe a recaptação de serotonina e norepinefrina
<b>Modulador específico de norepinefrina e serotonina</b>	Mirtazapina	Antagonista de receptores $\alpha_2$ e 5-HT <sub>2C</sub>
<b>Inibidor da recaptação de serotonina e agonista parcial do receptor 5HT<sub>1A</sub></b>	Vilazodone	Potente e seletivo inibidor da recaptação de serotonina e agonista parcial do receptor 5-HT <sub>1A</sub>
<b>Inibidores da MAO</b>	Selegina, Isocarboxazida, Fenelzina	Inibidores não seletivos das enzimas (MAO-A e MAO-B) que metabolizam as monoaminas (serotonina, dopamina e norepinefrina ) Inibidor seletivo de MAO-B
<b>MAO = Monamino oxidase, 5HT= Serotonina.</b>		

Fonte: Modificado de KUPFER, 2012.

Apesar do atual arsenal terapêutico, o tratamento da depressão ainda apresenta altas taxas de resistência, falhas na completa remissão dos sintomas e grande período de latência para o início da ação antidepressiva o que leva a problemas na adesão ao tratamento (CONNOLLY; THASE, 2012; GRAZIANI; VEDANA; I, 2014).

### **1.6.1 Novos alvos para o tratamento da depressão**

Nos últimos cinco anos, foram desenvolvidas várias estratégias para melhorar os resultados no tratamento da depressão, incluindo a utilização de novos compostos e vários medicamentos. Uma das estratégias foca no uso de antagonistas do receptor de glutamato (N-metil-D-aspartato) cujo efeito antidepressivo tem ação rápida, como sugere o estudo que utilizou cetamina intravenosa em dose repetida para o tratamento agudo de depressão resistente. (KRYSTAL, 2010; ROT M et al., 2010).

Outro avanço é a introdução de agomelatina — um agonista de melatonina (MT1 e MT2) e antagonista do receptor 5-HT<sub>2C</sub>. A agomelatina tem mostrado eficácia e tolerabilidade geralmente favorável, proporcionando uma alternativa promissora para pacientes que não respondem à farmacoterapia existente (GHOSH; HELLEWELL, 2007).

Seguindo a linha de novos alvos terapêuticos para depressão os anti-inflamatórios como a aspirina (MENDLEWICZ et al., 2006), doxiciclina (FERREIRA MELLO et al., 2013), celecoxib (MAJD et al., 2015) e etanercept (KRISHNAN et al., 2007; TYRING et al., 2006) tem demonstrado efeitos significativos, em estudos pré-clínicos. Nesse contexto, observa-se que a regulação de vias inflamatórias pode ser um novo caminho no desenvolvimento de fármacos antidepressivos.

Outra classe de fármacos que segue uma linha promissora na remissão dos sintomas da depressão e ansiedade são os antagonistas de receptores NK-1 (neurocinina-1). Sabe-se que a ligação da substância P (SP) aos receptores (NK-1) regula muitas funções biológicas no sistema nervoso central, tais como o comportamento emocional, estresse, depressão e ansiedade. Após a ligação de antagonistas dos receptores NK-1 ocorre uma inibição das funções biológicas acima mencionadas mediadas por SP. Dessa forma, estes antagonistas têm demonstrado ações ansiolíticas, antidepressivas e neuroprotetoras (MUÑOZ; COVENÁS, 2011)

### **1.7 Antagonistas dos receptores NK1**

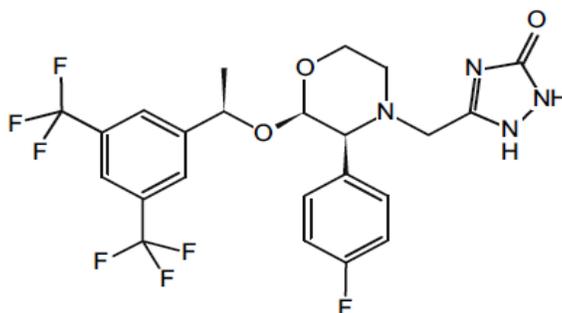
Pesquisas recentes apontam um papel importante do neuropeptídeo da família das taquicininas, a substância P e seu receptor NK1, na regulação da inflamação e do processamento emocional, com possível ação nas desordens depressivas. O antagonismo farmacológico ou genético do receptor NK1 mostrou-se capaz de atenuar o comportamento depressivo induzido por estresse e gerar fenótipo compatível com a ação antidepressiva observada em testes como o do nado forçado (KRAMER et al., 2004). Já a administração do antagonista de receptor NK-1 L-822.429 impediu o

efeito ansiogênico mediado por SP quando o peptídeo foi injetado na amígdala medial de camundongos (EBNER et al., 2004).

Os principais estudos de antagonismo do receptor NK1 são baseados no aprepitante (APR) (Figura 6), fármaco aprovado para o tratamento de náuseas e vômitos pós-operatórios e/ou induzidos por quimioterapia (CHAHL, 2006). O aprepitante foi desenvolvido pela Merck™, a partir de estudos de relação estrutura-atividade, que objetivavam a descoberta de fármacos antagonistas de receptor NK1, com maior afinidade e menos efeitos colaterais que os outros antagonistas de NK1R. Baseado em resultados pré-clínicos e clínicos, o APR foi selecionado para o tratamento de patologias nos quais o receptor NK1 desempenha papel fundamental, como o controle da êmese. Em 2006 a *Food and drug administration* (FDA-US) aprovou o uso do APR no tratamento das náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia (P.L.R. ANDREWS, S. BOYCE, S.D. BRAIN et al., 2004).

Estudos de fase II confirmaram a eficácia do antagonismo de receptor NK1 no tratamento da depressão, entretanto um estudo de fase III multicêntrico e controlado por placebo não obteve os mesmos resultados, usando um regime de dose mais alta comparada à usada com ação antiemética (KRAMER et al., 2004; KELLER et al., 2006). Considerando que o mecanismo exato da ação antidepressiva do APR ainda não está completamente elucidado este trabalho pretende contribuir para a determinação dos efeitos antidepressivos do APR em um modelo animal de depressão-símile induzidos pela administração crônica de lipopolissacarídeo.

**Figura 6 – Fórmula estrutural plana da molécula do aprepitante**



Fonte: Farmacopeia Norte Americana (USP). Fórmula molecular: C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>. Massa molar: 516.44 g.mol<sup>-1</sup>. Nome segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC): (5-{{[(2R,3S)-2-{{(R)-1-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]ethoxy}-3-phenylmorpholino]methyl}-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-one)

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A depressão é um problema de saúde pública gravemente incapacitante e de elevada prevalência. A proporção da população global com depressão em 2015 foi estimada em 4,4%. Ao longo da vida é mais comum entre as mulheres (5,1%) do que entre os homens (3,6%) (WHO, 2015). De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a depressão está entre os transtornos mentais mais prevalentes, afetando cerca de 322 milhões pessoas no mundo. Além do papel bem estabelecido das disfunções do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão, uma forte ligação entre depressão e fenômenos inflamatórios tem sido demonstrada. Evidências convincentes indicam que pacientes deprimidos usualmente têm um sistema imunitário desregulado com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (MAES, 2001; ZORRILLA et.al., 2001).

O modelo animal de administração sistêmica do lipopolissacarídeo, indutor de citocinas (LPS), tem-se mostrado robusto. Estudos sugerem que a inflamação tem um papel importante na etiologia do humor depressivo e que os sinais pró-inflamatórios podem atuar nos processos moleculares, que são alterados na depressão (KUBERA et.al., 2013).

Apesar dos avanços no conhecimento da neurobiologia da depressão e do mecanismo de ação dos antidepressivos, a terapia farmacológica atual ainda se baseia na antiga hipótese das monoaminas (SCHILDKRAUT, 1965; RACAGNI & POPOLI, 2010). Embora essas drogas proporcionem uma melhora nas condições clínicas dos pacientes, o seu início de ação é lento e apresentam muitos efeitos adversos. Além disso, 30% dos pacientes com depressão não respondem aos antidepressivos (NESTLER et al., 2002; BERLIM, 2007).

Na tentativa de elucidar os mecanismos fisiopatológicos da depressão e melhorar a eficácia do tratamento novas hipóteses além das monoaminas têm sido investigadas. Evidências derivadas de estudos anatômicos, neuroquímicos, farmacológicos e comportamentais que demonstram a localização dos neuropeptídeos de taquicinina, incluindo a substância P (SP), a neurocinina A, a neurocinina B e os seus receptores (NK1, NK2, NK3) em áreas do cérebro, relatam possível participação dessa via em mecanismos de estresse, regulação da ansiedade e do processamento da emoção, bem como o seu papel como neurotransmissores e/ou neuromoduladores dentro dessas estruturas e suas interações com outros sistemas de neurotransmissores, incluindo dopamina, noradrenalina e serotonina (EBNER, SARTORI e SINGEWALD, 2009).

Há evidências claras a partir de estudos em animais e em humanos de que a interferência com a transmissão de taquicinina pode modular o comportamento emocional. Com base nesses estudos e na evidência de transmissão suprarregulada dessas substâncias em indivíduos que sofrem de perturbações relacionadas com o stress, vários antagonistas de receptores de taquicinina foram desenvolvidos e estão atualmente sob investigação clínica. Acredita-se que substâncias com o valor terapêutico potencial de vários ligantes de taquicinas possam ser utilizadas para o tratamento de distúrbios relacionados ao estresse, incluindo transtornos de ansiedade, esquizofrenia e depressão. Devido a sua potente ação de modular a liberação das monoaminas em várias áreas cerebrais, os antagonistas de NK1 seriam capazes de diminuir o tempo de dessensibilização dos antidepressivos, quando administrados associados, além de exercer importante ação anti-inflamatória inibindo a ativação de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  em monócitos de pacientes depressivos (BARDELLI et. al., 2013).

Contudo, muitos estudos ainda são necessários para se determinar os mecanismos neuroprotetores de antagonistas de NK1 com eficácia na diminuição dos sintomas da depressão, proporcionando assim uma melhor qualidade de vida aos pacientes portadores desta doença. Considerando ainda a complexidade e heterogeneidade dos transtornos depressivos (NESTLER, 2008) e a falta de estudos na literatura sobre os efeitos de antagonistas de NK1 em modelos animais de depressão e as crescentes evidências da participação de alterações inflamatórias na patogênese da depressão (MAES et al., 2012), decidimos investigar os efeitos do antagonista de NK1 em modelo crônico de administração de LPS em camundongos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Gerais**

Determinar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do aprepitante (antagonista de NK1) em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração repetida de lipopolissacarídeo.

#### **3.2 Específicos**

Investigar alterações comportamentais em camundongos tratados com o aprepitante após administração repetida de LPS, utilizando testes de campo aberto, nado forçado e preferência por sacarose.

Avaliar o efeito do tratamento com o aprepitante sobre a expressão proteica de Iba-1 e NF- $\kappa$ B no hipocampo de animais submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração repetida de LPS.

Analisar o efeito do tratamento com aprepitante, sobre as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), anti-inflamatória (IL4) e Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado) de camundongos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por LPS.

Verificar o efeito do tratamento com aprepitante sobre a expressão gênica deIDO-1, TDO-2 e SAT-1 através da técnica de qPCR no hipocampo de animais submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração repetida de LPS.

Determinar a ação do aprepitante sobre as concentrações de triptofano e seus metabolitos no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por LPS.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

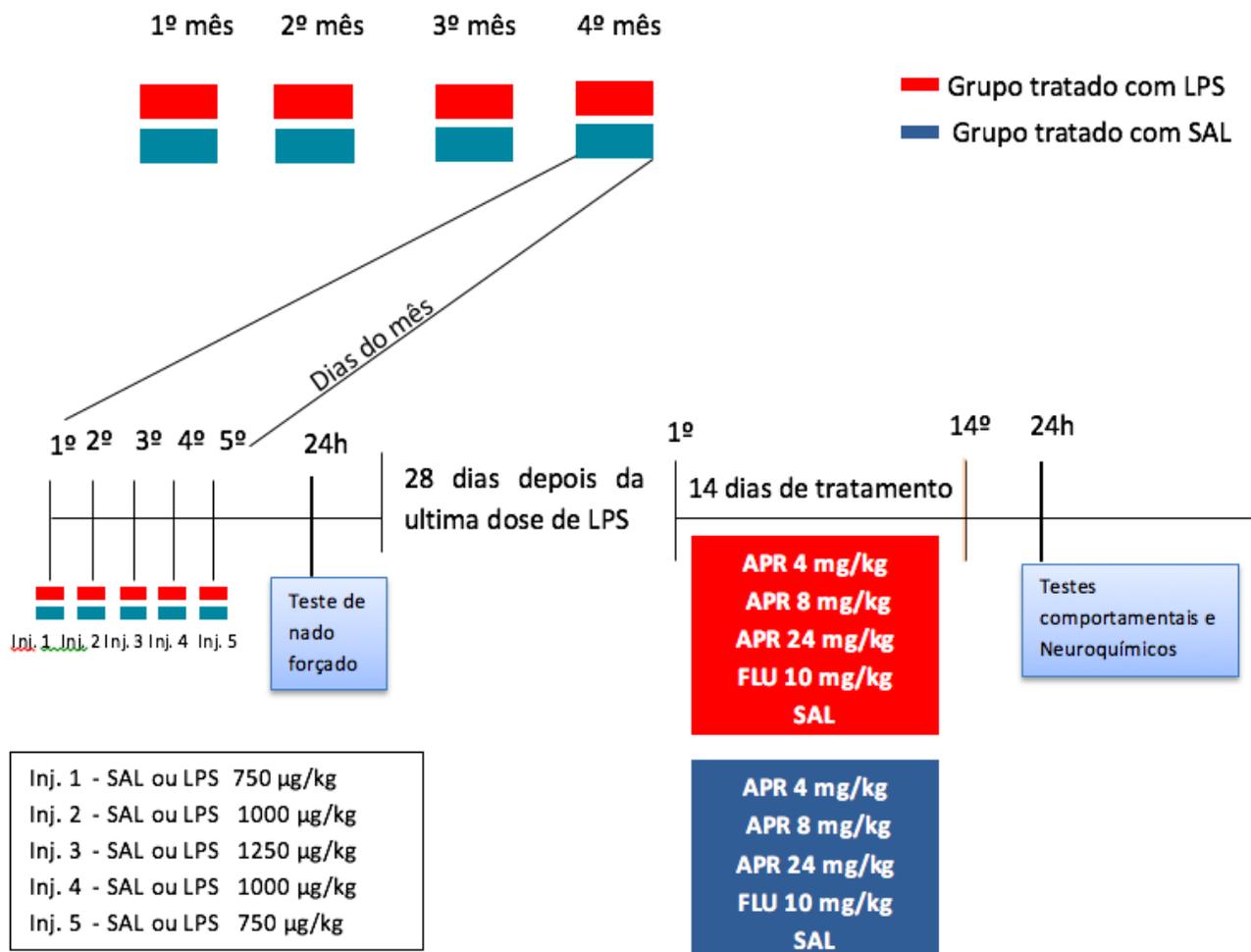
Camundongos *Swiss*, fêmeas, em idade adulta (30-40g), provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram ambientados em grupos de oito animais por gaiola de propileno com ração padrão e água *ad libitum*, mantidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da UFC através do protocolo n° 137/14. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos do Estados Unidos da América.

### 4.2 Delineamento Experimental

O comportamento de depressão-símile foi induzido através da administração repetida de LPS (*Escherichia coli*, cepa 055: B5 obtido da Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA e dissolvido em solução salina 0,9% p/v para o preparo das soluções nas concentrações: 750 µg/kg, 1000 µg/kg e 1250 µg/kg) em doses crescentes ao longo dos três primeiros dias e, então, a dose foi reduzida gradualmente nos dias 4 e 5, isto é, dia 1: 750 µg/kg, dia 2: 1000 µg/kg, dia 3: 1250 µg/kg, dia 4: 1000 µg/kg e dia 5: 750 µg/kg. Os cinco dias de desafio com LPS foram seguidos por um período de um mês livre da administração da endotoxina (Figura 7). Esse procedimento foi realizado por quatro meses de acordo com o trabalho publicado por Kubera e colaboradores (KUBERA et al., 2013a). Após 24 horas da última aplicação de LPS, foi realizado o teste de nado forçado, para verificação da efetividade do modelo. Vinte e oito dias após o quarto mês de administração de LPS, os animais foram subdivididos em três grupos, que receberam, durante 14 dias, o tratamento com o aprepitante, fluoxetina ou salina. O grupo 1 foi tratado com APR (Aprepitante, Emend® Merck, Sharp & Dohme, dissolvido em solução salina 0,9% p/v para a obtenção de soluções com as concentrações: 4 mg/kg, 8 mg/kg e 24 mg/kg) nas doses 4 mg/kg, 8 mg/kg e 24 mg/kg. O grupo 2 recebeu Fluoxetina (FLU) (Cloridrato de Fluoxetina da Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, EUA foi dissolvido em solução salina 0,9% p/v para obtenção de solução com concentração final de 0,1mg/mL) na dose de 10 mg/kg. O último grupo foi tratado com salina 0,9% (grupo LPS+SAL) na proporção de 0,1 mL para cada 10 g de peso corporal. Os animais do grupo controle (SAL+SAL) receberam solução salina 0,9% p/v via i.p que os demais animais. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e nado forçado 1 hora após a última administração das substâncias, já o teste de preferência pela sacarose foi realizado no dia seguinte. Os animais foram dissecados para realização

dos testes neuroquímicos 96 horas após o início do teste de preferência pela sacarose. As doses de LPS foram baseadas em estudo prévio publicado por Dantzer e colaboradores (MORMÈDE et al., 2004), enquanto as doses de APR foram calculadas de acordo com o método de normalização da área de superfície corpórea, segundo demonstrado por Ahmad e colaboradores (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008) e tendo como base a dose utilizada em estudos clínicos. Cada grupo é constituído por oito animais por grupo.

**Figura 7 – Diagrama representativo do protocolo de tratamento**



Fonte: Do próprio autor. Representação do tempo de tratamento com Lipopolissacarídeo (LPS) e subsequente subdivisão dos animais nos grupos tratados com aprepitante (APR), salina (SAL) e fluoxetina (FLU). Os animais do grupo controle foram tratados pelo mesmo período que os demais com solução salina 0,9% p/v. Todas as administrações foram realizadas via i.p.

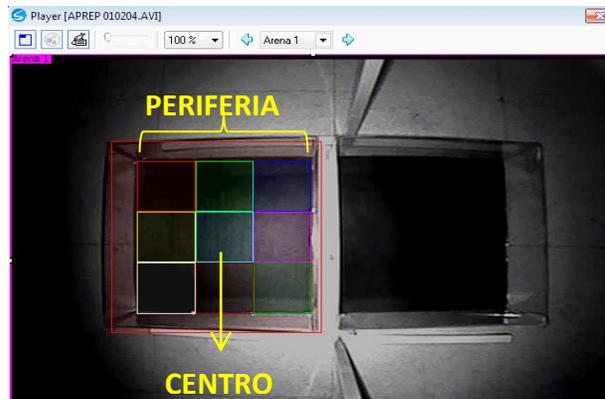
## 4.3 Testes Comportamentais

### 4.3.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos do tratamento com LPS, APR e FLU sobre a atividade locomotora e exploratória dos animais, bem como identificar comportamentos de ansiedade nos animais com o fenótipo depressivo (PRUT; BELZUNG, 2003) e uma possível atividade ansiolítica do APR. O teste foi realizado em uma arena (30 cm X 30 cm) cercada por paredes de acrílico, com o chão dividido em nove quadrantes de iguais tamanhos (Figura 8), com protocolo adaptado a partir de trabalho prévio realizado por Archer (ARCHER, 1973). A atividade exploratória do animal foi registrada durante 6 minutos, sendo o primeiro minuto o período de latência, para adaptação do animal ao novo ambiente, portanto não contabilizado para a análise. Também obtivemos o mapa da trajetória percorrida por cada animal na arena. Os parâmetros avaliados foram: Tempo gasto em segundos (s) no quadrante central; A relação entre a atividade locomotora no quadrante central e nos quadrantes da periferia da arena (Relação C/P); O tempo de imobilidade em segundos (s) e o número de transições entre os quadrantes da arena. O teste foi realizado em uma sala com som atenuado, na condição de baixa intensidade de luz vermelha, gravado e analisado utilizando o *software SMART video tracking* versão 3.0.03 da Panlab Harvard Apparatus®.

Os roedores, espontaneamente, preferem a periferia do aparato à atividade exploratória na região central da arena e esse comportamento é denominado tigmotaxia (CAMPOS et al., 2013). Dessa forma, são resultados indicativos de atividade ansiolítica: o aumento da permanência do animal na região central do aparato e a elevação da razão entre o tempo gasto em atividade no centro e o tempo em atividade total (PRUT; BELZUNG, 2003).

**Figura 8 – Foto do aparato para realização do teste do campo aberto**



Fonte: Do próprio autor. Foto da tela de captura do *software* mostrando as arenas utilizadas para o teste. Pode-se observar que a arena à esquerda encontra-se dividida em 9 quadrantes de iguais tamanhos (10 cm X 10 cm) com regiões central e periférica identificadas.

#### **4.3.2 Teste do nado forçado**

O teste do nado forçado, descrito primeiramente por Porsolt, (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1978) é um dos testes mais utilizados na investigação de novas drogas antidepressivas. Nesse teste, os animais foram inseridos individualmente em cilindros de acrílico (50 cm de altura; 18 cm de diâmetro), contendo água da altura de 30 cm do solo do aparato (Figura 9), por um período de 5 minutos no qual foi cronometrado o tempo total de imobilidade para cada animal. Considerou-se como imobilidade quando o animal fez apenas os movimentos mínimos necessários para se manter acima do nível da água. O teste avaliou o comportamento do animal frente a uma situação inescapável, atuando como modelo preditivo de depressão. E espera-se que o animal com fenótipo depressivo apresente tempo de imobilidade superior ao animal saudável.

**Figura 9 – Desenho representativo do aparato para o teste do nado forçado**



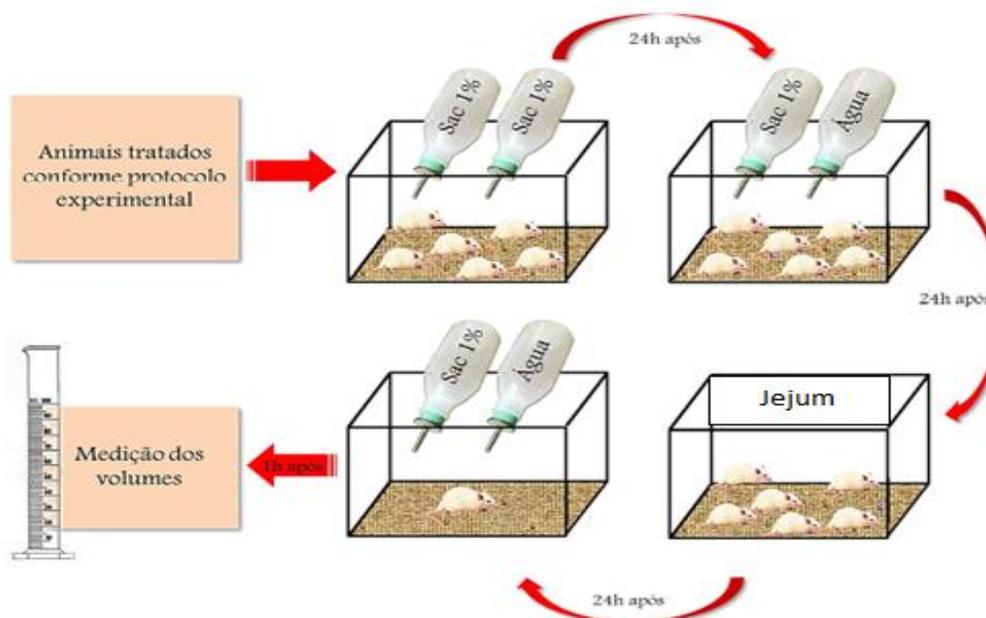
Fonte: Quevedo et al., 2013.

### 4.3.3 Teste da preferência pela sacarose

O teste de preferência pela sacarose foi realizado como uma medida de anedonia nos animais com comportamentos de depressão-símile (MAO et al., 2009). Os animais passaram por uma etapa de adaptação com a solução de sacarose 1% da seguinte forma: 72 horas antes do teste, foram colocadas, em cada gaiola, duas garrafas com solução de sacarose 1% p/v e 24 horas depois, uma das garrafas de sacarose 1% foi trocada por uma garrafa contendo água (Figura 10). Depois da adaptação, os animais foram privados de água e comida por 24 horas. O teste foi realizado após 24 horas de jejum, com os animais alocados em gaiolas separadamente e tendo livre acesso a duas garrafas contendo 100 ml de solução de sacarose 1% e 100 ml de água cada uma. Após 1 hora, os volumes de solução de sacarose 1% e de água foram medidos e a preferência pela sacarose foi calculada em valores percentuais, através da razão entre o volume consumido de sacarose 1% e o volume consumido total somando-se os volumes de sacarose 1% e água e multiplicando o resultado dessa razão por 100, como mostra a equação a seguir:

$$\text{Preferência pela Sacarose}(\%) = \frac{\text{Consumo de Sacarose (ml)}}{\text{Consumo de Sacarose (ml)} + \text{Consumo de Água(ml)}} \times 100$$

Figura 10 – Desenho representativo do teste de preferencia pela sacarose.



Fonte: adaptado Sousa, 2014.

#### **4.4 Testes Biomoleculares e Neuroquímicos**

Os testes biomoleculares e neuroquímicos foram realizados, após o último teste de comportamento. Para tanto os animais foram sacrificados por rápida decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados em solução salina gelada. As regiões cerebrais Pré-frontal (PF), Hipocampo (HC), e Corpo Estriado (CE) foram dissecadas, congeladas e armazenadas a -70 °C até serem utilizadas para os ensaios.

##### **4.4.1 Dosagem de BDNF e de citocinas (IL1 $\beta$ , IL-4, TNF- $\alpha$ e INF- $\gamma$ ) no cortex pré- frontal, hipocampo e corpo estriado por ensaio imunenzimatico (ELISA)**

###### **4.4.1.1 Técnica de ELISA**

Os níveis de BDNF (neuroplasticidade) e de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias IL1 $\beta$ , IL-4, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  foram quantificados no cortex pré-frontal hipocampo e corpo estriado por ELISA para avaliar os efeitos do aprepitante na neuroinflamação. A detecção das citocinas foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL1 $\beta$  ou IL-4 ou TNF- $\alpha$  ou INF- $\gamma$  ou BDNF por 18h em temperatura ambiente com 100  $\mu$ L de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200  $\mu$ L de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200  $\mu$ L de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100  $\mu$ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 $\mu$ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção da determinada interleucina em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200  $\mu$ L de tampão de lavagem e incubadas com 100  $\mu$ L de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com 200 $\mu$ L de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100  $\mu$ L da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando-se 50  $\mu$ L solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

###### **4.4.2 Expressão proteica de NF- $\kappa$ B e Iba-1 por Western Blotting**

Para avaliar a expressão protéica de NF- $\kappa$ B e Iba-1 hipocampal realizou-se Western Blotting após as etapas de extração e dosagem de proteínas.

#### 4.4.2.1 Extração de proteínas

O hipocampo foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido e foi inserido em microtubo contendo 100 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100 µL de RIPA). Em seguida, as amostras foram agitadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

#### 4.4.2.2 Método de Bradford para dosagem de proteína

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando a absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160 µL de amostra e 40 µL de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

#### 4.4.2.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 50 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), agitando por 10 s, aquecendo a banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, “overnight” a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos rat anti- NFκ-B IgG primary antibody (1:600; Santa Cruz, USA), rat anti- Iba IgG primary

antibody (1:1000; Wako, USA) e rat anti- $\alpha$ - tubulin IgG primary antibody (1:4000; Sigma, USA) diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ImageQuant 300 Imager (GE Healthcare, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

#### 4.4.3 Quantificações do Triptofano e seus metabólitos por HPLC

Os níveis cerebrais de triptofano e seus metabólitos (serotonina, quinurenina e ácido quinolínico) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Waters Alliance, e2695). A área cerebral (hipocampo) foi utilizada para preparar homogenatos a 20%. O tecido cerebral foi macerado em ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) a 1% por 40 segundos e centrifugado por 15 minutos, 12.000rpm, 4°C. O sobrenadante foi separado e uma alíquota de 10 $\mu$ l foi injetada no HPLC.

Para determinar a concentração de triptofano e de seus metabólitos foi utilizada uma coluna C18, 150 x 4,6 mm, 4 $\mu$  (PHENOMENEX®). A fase móvel foi composta de duas fases: A (acetato de sódio grau HPLC-SIGMA® - 0,1M, pH 6,2); B (acetonitrila grau HPLC (TEDIA®) 100%). A corrida se deu em gradiente de fluxo conforme a tabela:

**Tabela 3 – Gradiente de fluxo para determinação simultânea de triptofano e seus metabólitos por HPLC**

Tempo (min)	Fluxo ( $\mu$ l)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	0,5	94	6
4	0,5	80	20
10	0,5	80	20
11	1	80	20
18:30	1	80	20
19	0,5	94	6
24	0,5	94	6

**Fonte:** Elaborado pela autora.

As soluções padrão de triptofano (SIGMA®) e seus metabólitos (SIGMA®) foram preparadas com fase móvel A (ácido quinolínico, serotonina, quinurenina e triptofano) nas concentrações de 0,2 mM. Os cromatogramas foram registrados e quantificados pelo software (Empower 3 Chromatography Data Software: Waters). As concentrações de ácido quinolínico, serotonina, quinurenina e triptofano nas áreas cerebrais foram determinadas por comparação com os padrões injetados no HPLC no dia do experimento (PRESITS & MOLNÁR-PERL, 2003).

#### **4.4.4 Investigação da Expressão Gênica de SAT 1, IDO 1 e TDO 2 por qPCR**

##### **4.4.4.1 Preparação das amostras**

Os fragmentos de hipocampo dos animais foram retirados e macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos macerados foram adicionados em microtubo com 300 µL de RNAlater® (SIGMA, EUA). Em seguida foram armazenados a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

##### **4.4.4.2 Extração do RNA**

O RNA total de cada amostra foi isolado usando kit de extração de RNA (Promega). Resumidamente, amostras de 100 µL de tampão de lise foram misturadas cinco vezes por inversão. Adicionou-se às amostras 350 µL de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em seguida, as amostras foram aquecidas por três minutos a 70°C, com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucleicos e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e adicionou-se 200 µL de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura foi transferida para *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 11200 RPM por um minuto. Adicionou-se 600 µL de solução de lavagem e em seguida o material foi centrifugado por 11200 RPM por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras foram tratadas com DNase para reduzir a contaminação com o DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Decorrido este tempo, 200 µL de DNase *stop solution* foram adicionados e as amostras centrifugadas por 1 min a 11200 RPM. Logo em seguida, adicionou-se tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas, conforme relatado anteriormente. Adicionou-se 250 µL de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 2 min em 11200 RPM. Na etapa seguinte, o *spin* foi inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 µL de H<sub>2</sub>O livre de nuclease foram adicionados e os microtubos foram centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* foi descartado e o RNA extraído foi armazenado no freezer -70°C. Após a extração do RNA de cada amostra, efetuou-se a sua quantificação, com 1µL de RNA de cada

amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Concomitante a dosagem em ng/ $\mu$ L, realizou-se a avaliação da qualidade do RNA extraído, o qual foi obtido por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa relacionado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

#### 4.4.4.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA). O volume final de cada amostra foi de 20  $\mu$ L: 2  $\mu$ L do reagente 10x tampão da enzima; 0,8  $\mu$ L de oligonucleotídeos; 2  $\mu$ L de primer; 1  $\mu$ L da enzima transcriptase reversa; 1 ng de RNA, sendo o volume utilizado em  $\mu$ L dependente da concentração inicial extraída; H<sub>2</sub>O de nucleases para completar 20  $\mu$ L. O protocolo da reação foi realizado à 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado a -20° C até a sua utilização no PCR quantitativo em tempo real.

#### 4.4.4.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (LightCycler® 96 Real-Time PCR System, Roche Life Science), utilizando kit de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todos os primers utilizados e as condições do qPCR estão apresentadas no quadro 1.

Os valores de *Thresholdcycle* (C<sub>q</sub> ou C<sub>t</sub>), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados foram exportados para o Microsoft Office Excel 2010, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

**Quadro 1 – Primers utilizados forward e reverse para análise de q-PCR**

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<b>IDO 1 (indolamina 2,3-dioxigenase 1)</b>	<b>CGGACTGAGAGGACACAGGTTAC</b>	<b>ACACATACGCCATGGTGATGTAC</b>
<b>TDO2 (triptofano 2,3-dioxigenase)</b>	<b>ATGAGTGGGTGCCCGTTTG</b>	<b>GGCTCTGTTTACACCAGTTTGAG</b>
<b>SAT 1 (espermidina/espermina N-acetiltransferase 1)</b>	<b>CCTGVGACTGATCAAGGAACT</b>	<b>CAACCAGGCAGTGGTAGAAGG</b>

**Fonte:** Elaborado pela autora.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e os resultados analisados por One-way ANOVA seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Em todas as análises estatísticas, foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade com valores menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Teste do Campo aberto

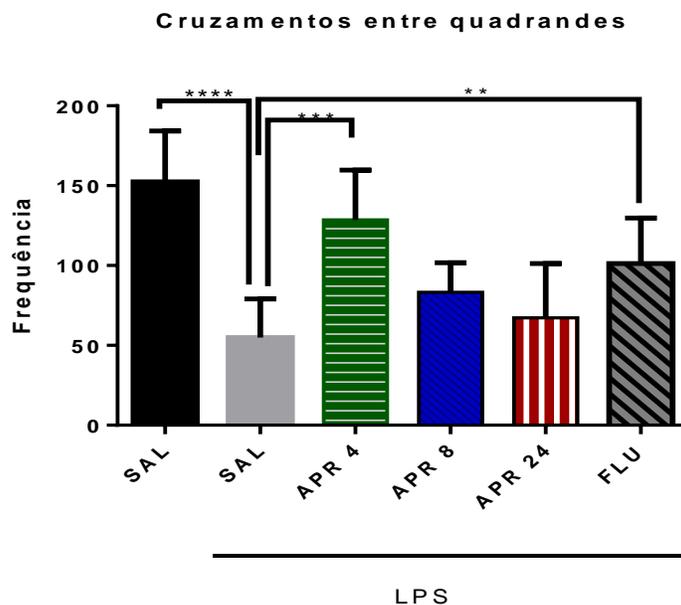
Com esse teste, foi possível avaliar que o tratamento com o APR e FLU foi capaz de reverter as alterações na atividade locomotora induzidas pela administração repetida de LPS [F (5, 43) = 16,14;  $p < 0,0001$ ]. Os animais que receberam solução salina 0,9% representam o grupo controle. Como mostrado na figura 11, a administração repetida de LPS reduziu significativamente o número de cruzamentos entre os quadrantes da arena em relação ao grupo Controle ( $p < 0,0001$ ). O tratamento com aprimitante na dose de 4 mg/kg ( $p < 0,001$  vs. LPS+SAL) e fluoxetina ( $p < 0,01$  vs. LPS+SAL) reverteu significativamente as alterações no número de cruzamentos induzidas por LPS. O tratamento com APR 8 e 24 mg/kg não mostrou significância.

O tempo de imobilidade no teste de campo aberto é importante para analisar os sinais iniciais de comportamentos de doença (*sickness behaviour*). Como está mostrado na figura 12, a administração intermitente de LPS aumentou significativamente o tempo gasto imóvel em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). O tratamento com APR nas doses 4 e 24 mg/kg reverteu a imobilidade em relação ao grupo LPS+SAL ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ ). Os animais submetidos ao tratamento com FLU também obtiveram uma reversão no tempo de imobilidade induzido pela administração de LPS ( $p < 0,01$ ).

Como pode ser visto na figura 13, com relação aos parâmetros utilizados para avaliar atividade ansiolítica no teste do campo aberto (razão centro/periferia e tempo de permanência no quadrante central), o tratamento com APR nas doses 8 e 24 mg/kg apresentou fenótipo ansiolítico [F (5, 31) = 14,13;  $p < 0,0001$ ], uma vez que promoveu elevação no tempo de permanência dos animais no quadrante central da arena, significativamente em relação aos animais do grupo controle (APR 8 vs. controle  $p = 0,0003$ ; APR24 vs. Controle  $p < 0,0001$ ) e grupo LPS (APR 8 vs. LPS+SAL  $p = 0,0009$ ; APR 24 vs. LPS+SAL  $p < 0,0001$ ).

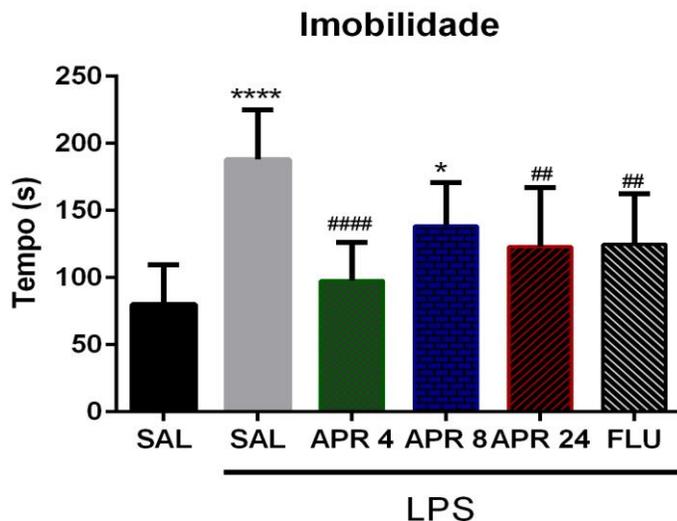
Nas figuras 14 e 15 podemos observar que o tratamento com APR 24 mostrou-se capaz de elevar a relação centro/periferia, mostrando aumento da atividade exploratória do animal no quadrante central da arena do campo aberto (APR 24 vs. Controle  $p = 0,0201$ ; APR 24 vs. LPS+SAL  $p = 0,0029$ ).

**Figura 11 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) na atividade locomotora dos animais submetidos ao teste do campo aberto**



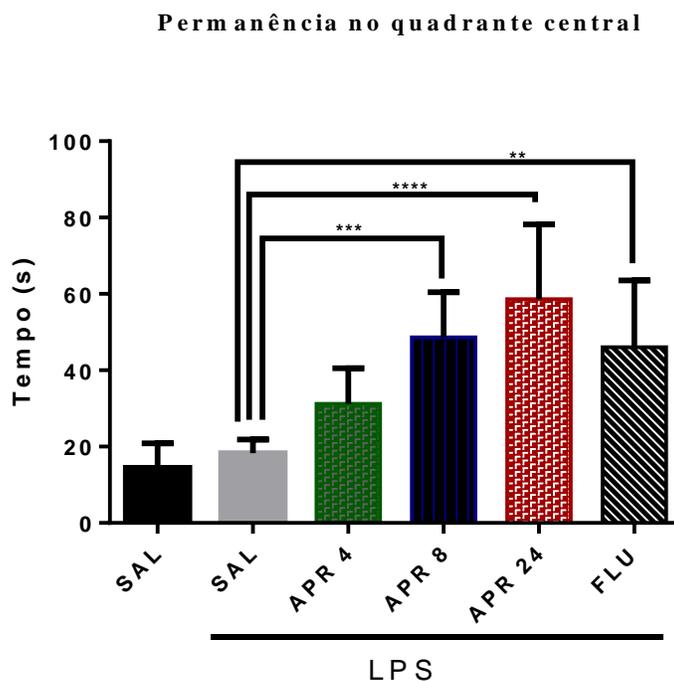
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. O teste do campo aberto foi realizado 1 hora após a última administração das drogas. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período que os demais animais. As barras representam a média da frequência de cruzamentos  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Controle; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. LPS+SAL; \*\*  $p < 0,01$  vs. LPS+SAL).

**Figura 12 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do campo aberto**



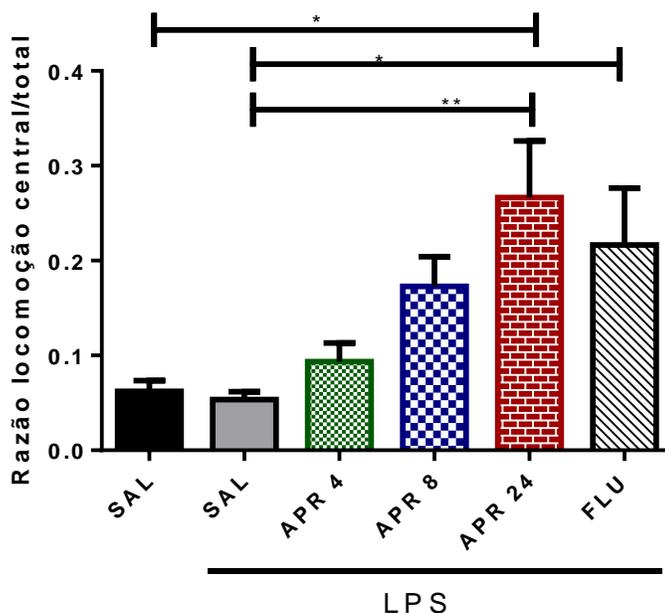
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. O teste do campo aberto foi realizado 1 hora após a última administração das drogas. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período que os demais animais. As barras representam a média do tempo de imobilidade  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (\*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Controle; ##### $p < 0,0001$  vs. LPS+SAL; \* $p < 0,05$  vs. Controle; ## $p < 0,01$  vs. LPS+SAL)

**Figura 13 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no tempo de permanência dos animais no quadrante central do campo aberto**



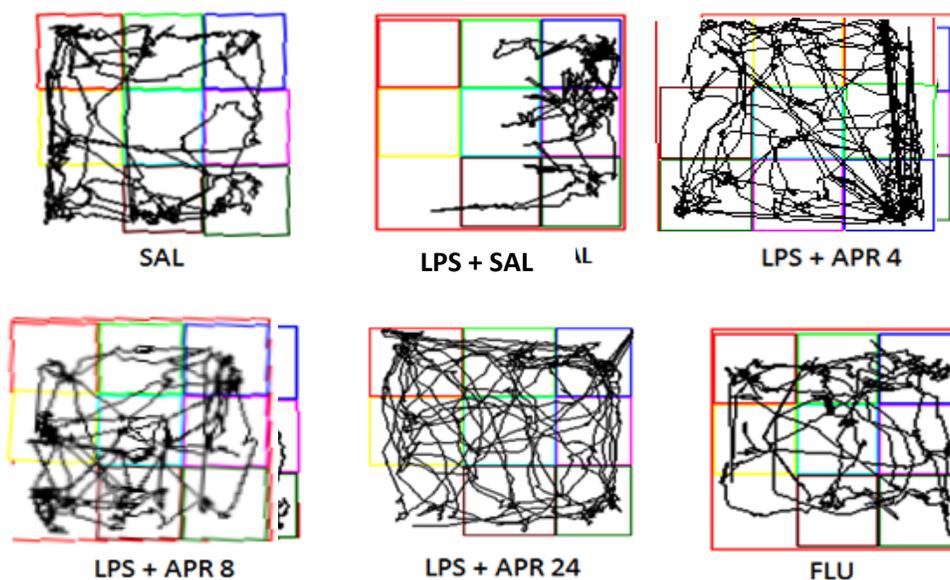
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. O teste do campo aberto foi realizado 1 hora após a última administração das drogas. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período que os demais animais. As barras representam a média do tempo de permanência no centro  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. (\*\* $p=0,0009$  vs. LPS+SAL; \*\*\*\* $p<0,0001$  vs. LPS+SAL; \* $p=0,0013$  vs. LPS+SAL).

**Figura 14 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) na razão entre a atividade no quadrante central do aparato e a atividade em todos os quadrantes do teste do campo aberto**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. O teste do campo aberto foi realizado 1 hora após a última administração das drogas. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período que os demais animais. As barras representam a média da razão  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Relação entre o tempo gasto em atividade no quadrante central e o tempo em atividade em todos os quadrantes da arena (\* $p=0,0201$  vs. Controle; \*\* $p=0,0029$  vs. LPS+SAL; \* $p=0,0119$  vs. LPS+SAL).

**Figura 15 – Mapa do trajeto percorrido pelos animais no teste do campo aberto**

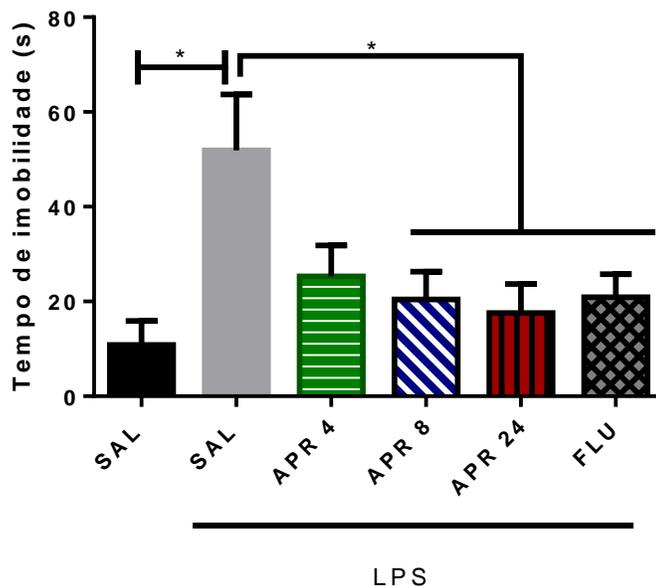


Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. O teste do campo aberto foi realizado 1 hora após a última administração das drogas. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período de os demais animais. Cada arena apresenta o animal mais representativo de cada grupo. A presença e o deslocamento do animal foram detectados pelo software a partir do seu centro de massa. O trajeto percorrido pelo animal na arena está representado pela linha preta.

## **6.2 Teste do nado forçado**

No teste do nado forçado, como mostrado na figura 16, os animais que receberam administração intermitente com LPS apresentaram um período de imobilidade significativamente maior em relação aos animais do grupo controle [ $F(5, 50) = 3,527$ ;  $P = 0,0083$ ]. O tratamento com APR 8 ( $p = 0,0402$ ), APR 24 ( $p = 0,0192$ ) e fluoxetina ( $p = 0,0201$ ) mostrou-se capaz de reverter significativamente a imobilidade induzida pelo LPS, mostrando possível efeito antidepressivo.

**Figura 16 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado**

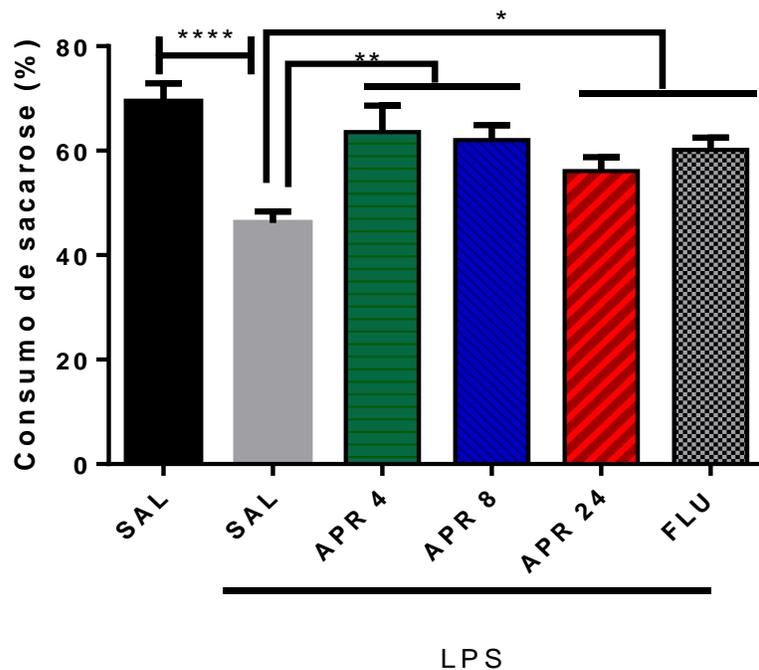


Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. O teste do nado forçado foi realizado 1 hora após a última administração das drogas. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período de os demais animais. As barras representam a média do tempo de imobilidade  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Tempo de imobilidade durante o teste (\* p= 0,0173vs. Controle; \* p= 0,0402 vs. LPS+SAL; \* p= 0,0192vs. LPS+SAL; \* p= 0,0201vs. LPS+SAL).

### **6.3 Teste da preferência pela sacarose**

O teste da preferência pela sacarose foi utilizado como indicativo de comportamento de anedonia, bem como para avaliação da capacidade do APR em reverter a anedonia nesses animais. De acordo com ANOVA de uma via, ocorreu uma alteração significativa entre controle e os grupos tratados no teste de preferência por sacarose [ $F(5, 69) = 6,015$ ;  $P = 0,0001$ ]. Como pode ser visto na figura 17, os animais que receberam administração repetida com LPS reduziram o consumo de sacarose em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). O tratamento com APR 4 ( $p = 0,0067$ ), APR 8 ( $p = 0,0095$ ) mostrou-se capaz de reverter significativamente, como também o grupo APR 24 ( $p = 0,0102$ ) e FLU ( $p = 0,0204$ ) que conseguiram reverter o fenótipo de anedonia em comparação com o grupo LPS+SAL.

**Figura 17 – Efeito do tratamento com aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) na preferência pelo consumo de sacarose**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. O teste da preferência pela sacarose foi realizado 24 horas após a última administração das drogas. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do consumo de solução de sacarose 1%  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Consumo de sacarose (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Controle; \*\*  $p = 0,0067$  vs. LPS+SAL; \*\*  $p = 0,0095$  vs. LPS+SAL; \*  $p = 0,0102$  vs. LPS+SAL; \*  $p = 0,0204$  vs. LPS+SAL).

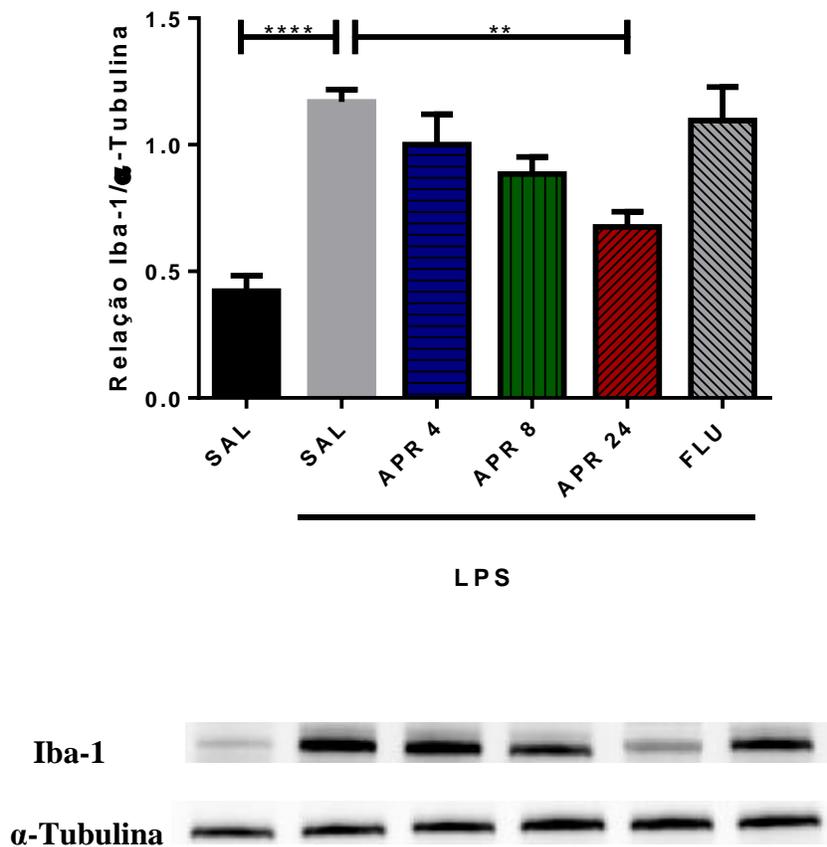
## 6.4 Avaliações biomoleculares e neuroquímicas

### 6.4.1 Determinações da expressão proteica de Iba-1 e NF-κB pela técnica de Western Blot

A figura 18 mostra a expressão proteica de Iba-1, uma proteína de ligação do cálcio expressa em macrófagos/micróglia que está relacionada à ativação microglial, liberação de óxido nítrico, ativação de fatores de transcrição com NF-κB e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL1-β. Os animais do grupo LPS+SAL ( $p < 0,0001$ ) mostraram um aumento significativo na expressão proteica de Iba-1 hipocampal quando comparado aos animais do grupo controle [ $F(5, 16) = 11,59$ ;  $P < 0,0001$ ] como pode ser visto na figura 18. Somente a dose de APR 24 ( $p = 0,0061$ ) foi capaz de reduzir significativamente a expressão de Iba-1 em comparação ao grupo LPS.

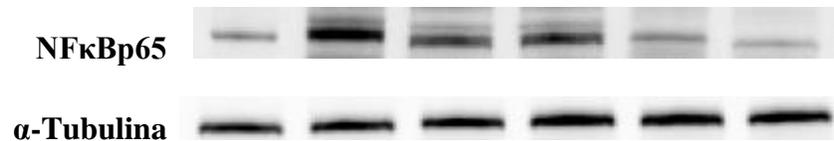
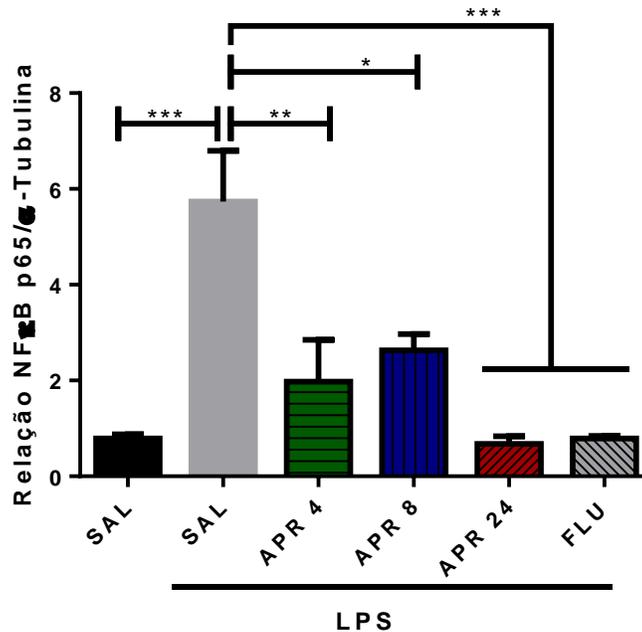
Para confirmar a ativação da via inflamatória induzida pelo tratamento intermitente com LPS, foram avaliadas concentrações de NF-κB, um importante fator de transcrição que participa da resposta inflamatória. Os resultados apresentados na figura 19 mostram que houve um aumento significativo na expressão proteica de NF-κB no grupo LPS+SAL ( $p = 0,0001$ ) quando comprado ao grupo Controle [ $F(5, 16) = 12,02$ ;  $P < 0,0001$ ]. Os animais que foram tratados com APR4 ( $p = 0,0046$ ), APR8 ( $p = 0,0118$ ), APR 24 ( $p = 0,0002$ ) e FLU ( $p = 0,0001$ ) conseguiram reduzir significativamente a expressão de NF-κB hipocampal quando comparados ao grupo LPS, demonstrando um possível efeito anti-inflamatório.

**Figura 18 – Expressão proteica de Iba-1 por imunoblotting no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de Iba-1 hipocampal foram mensurados por imunoblotting. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do Iba-1  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de Iba-1 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Controle; \*\*  $p = 0,0061$  vs. LPS+SAL).

**Figura 19 – Expressão proteica de NF- $\kappa$ B por imunoblotting no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de NF- $\kappa$ B hipocampal foram mensurados por imunoblotting. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do NF- $\kappa$ B  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de NF- $\kappa$ B (\*\* $p$ = 0,0001 vs. Controle; \* $p$ = 0,0046 vs. LPS+SAL; \* $p$ = 0,0118 vs. LPS+SAL; \*\*\* $p$ = 0,0002 vs. LPS+ SAL; \*\*\* $p$ = 0,0001 vs. LPS+SAL).

#### 6.4.2 Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de IL4 em áreas cerebrais de camundongos

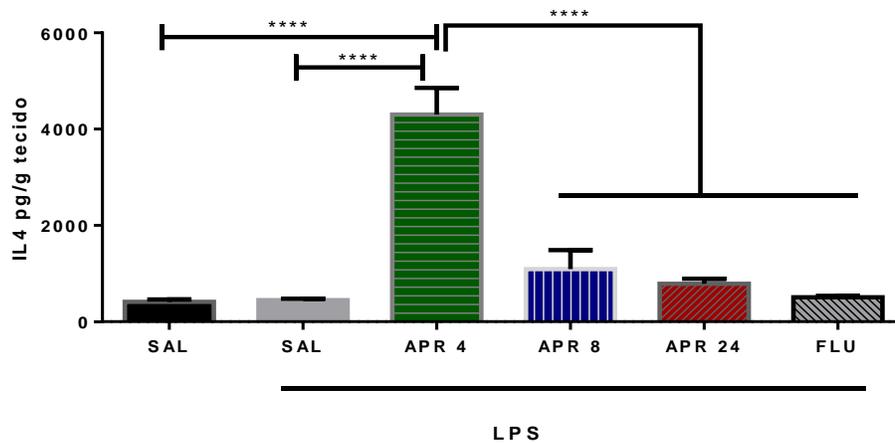
A inflamação produz alterações endócrinas, autonômicas e comportamentais e isso se deve à ativação de células do sistema imune e liberação de citocinas pró (IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) e anti- inflamatórias (IL4). Essas citocinas desempenham um importante papel na patogênese da depressão.

As dosagens de IL4 no CPF de animais do grupo LPS+SAL não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo controle (Figura 20). Já os animais tratados com APR 4 apresentaram um aumento considerável nas concentrações de IL4 quando comparado com os demais grupos [F (5, 42) = 28,73, p<0,0001].

A região do hipocampo também apresentou resultados semelhantes ao que foi visto no CPF, os grupos LPS e controle não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 21). Diferente dos outros grupos, os animais tratados com APR4 apresentaram um aumento significativo na concentração de IL4 quando comparado ao grupo LPS+SAL [F (5, 34) = 28,87, p<0,0001].

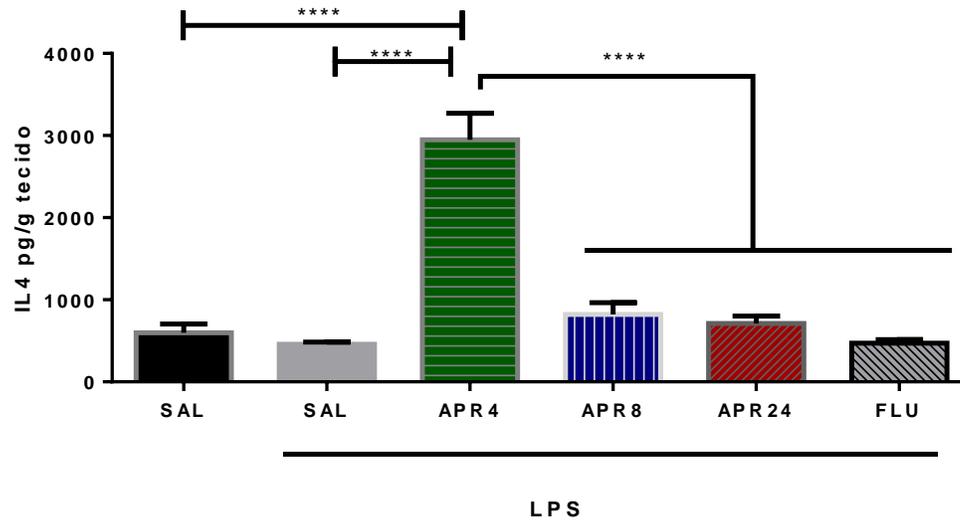
Conforme os dados obtidos nas demais áreas cerebrais estudadas, concentrações aumentadas de IL4 foram observadas no corpo estriado (Figura 22) do grupo APR4 (p<0,0001) quando comparadas com o grupo LPS [F (5, 42) = 8,439, p<0,0001]. Os tratamentos APR8, APR24 e FLU não induziram aumento nas concentrações de IL4 no CE quando comparado ao grupo LPS+SAL. Semelhante ao encontrado no CPF e no HC, os grupos controle e LPS não apresentaram diferença significativa entre as concentrações de IL4 no CE.

**Figura 20 – Alterações nas concentrações de IL4 induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no córtex pré-frontal de animais tratados com administração intermitente de LPS**



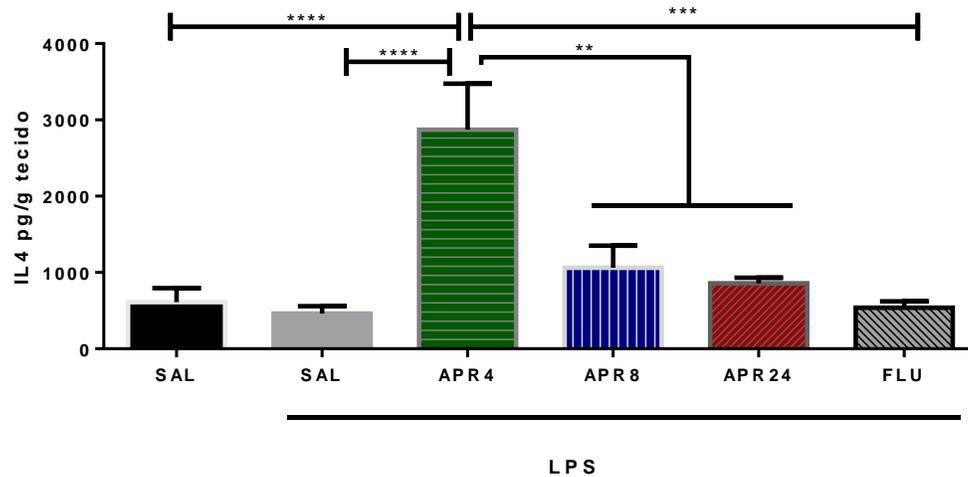
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de IL4 foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média de IL4  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IL4 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs Controle; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs LPS+SAL \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. APR4)

**Figura 21 – Alterações nas concentrações de IL4 induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de IL4 foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média de IL4  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IL4 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs Controle; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs LPS+SAL \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. APR4)

**Figura 22– Alterações nas concentrações de IL4 induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no corpo estriado de animais tratados com administração intermitente de LPS**



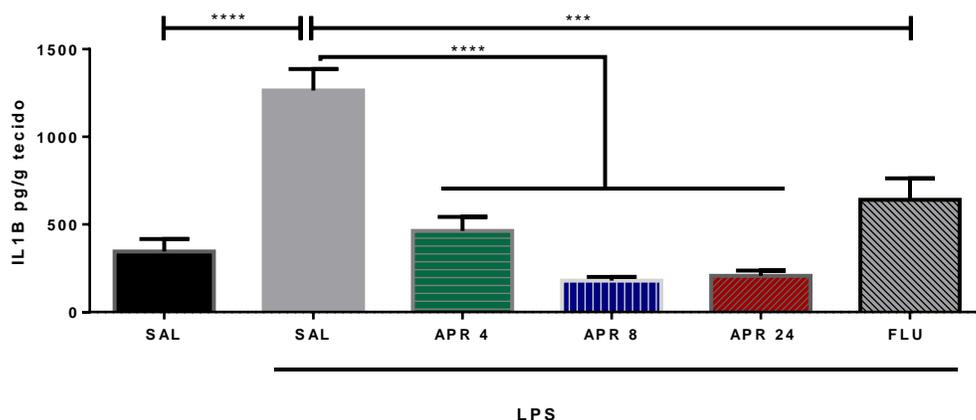
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de IL4 foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média de IL4  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IL4 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs Controle; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs LPS+SAL; \*\*  $p = 0,0045$  vs. APR4; \*  $p = 0,0012$  vs. APR4; \*\*\*  $p = 0,0003$  vs. APR4)

### 6.4.3 Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de IL1 $\beta$ em áreas cerebrais de camundongos

Foi observado no córtex pré-frontal (Figura 23) um aumento significativo nos níveis de IL1 $\beta$  no grupo LPS+SAL quando comparado com o controle [F (5, 52) = 17,69; p<0,0001]. A administração de APR4 (p<0,0001), APR8 (p<0,0001) ou APR24 (p<0,0001) reverteu significativamente as altas concentrações de IL1 $\beta$  quando comparados com animais LPS+SAL. Resultado semelhante foi visto pelo grupo FLU (p=0,0001) que conseguiu diminuir as concentrações dessa interleucina pró-inflamatória comparado ao grupo LPS+SAL. Aumento de IL1 $\beta$  também foi observado no hipocampo de animais LPS+SAL quando comparados com o controle [F (5, 54) = 9,751; p<0,0001] (Figura 24). As doses de APR 4 (p=0,0019), APR 8 (p<0,0001) ou APR 24 (p=0,0011) apresentaram resultados semelhantes ao que foi visto no córtex pré-frontal, quando comparadas ao grupo LPS. Já o grupo FLU não conseguiu reverter às concentrações aumentadas de IL1 $\beta$  no hipocampo.

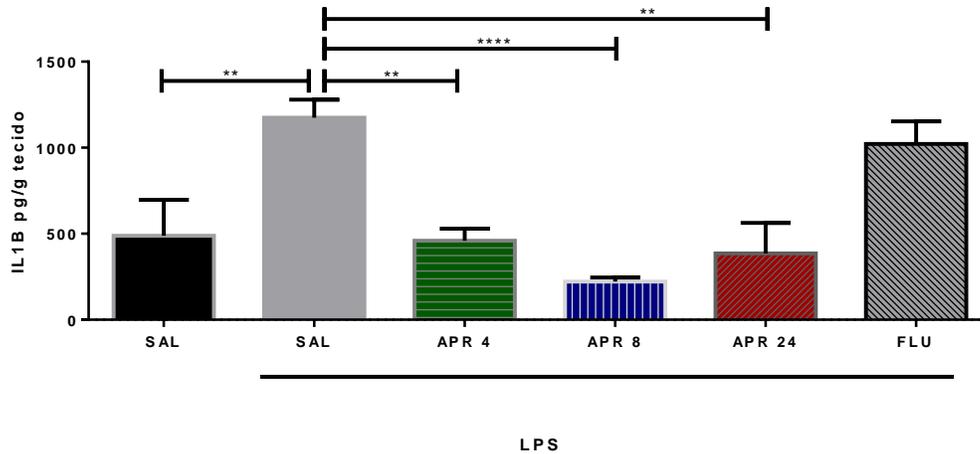
No corpo estriado as concentrações de IL1 $\beta$ , nos animais LPS+SAL, mantiveram-se elevadas quando comparado ao grupo controle [F (5, 54) = 16,01; p<0,0001] (Figura 25). Os tratamentos com APR 4 (p= 0,0291), APR 8 (p<0,0001) ou APR 24 (p<0,0001) demonstraram inibição nas concentrações dessa interleucina pró-inflamatória, quando comparados com o grupo LPS+SAL. O grupo FLU, semelhantemente ao que foi observado no hipocampo, não reduziu os níveis de IL1 $\beta$  quando comparado ao grupo LPS.

**Figura 23 – Alterações nas concentrações de IL1 $\beta$  induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no córtex pré-frontal de animais tratados com administração intermitente de LPS**



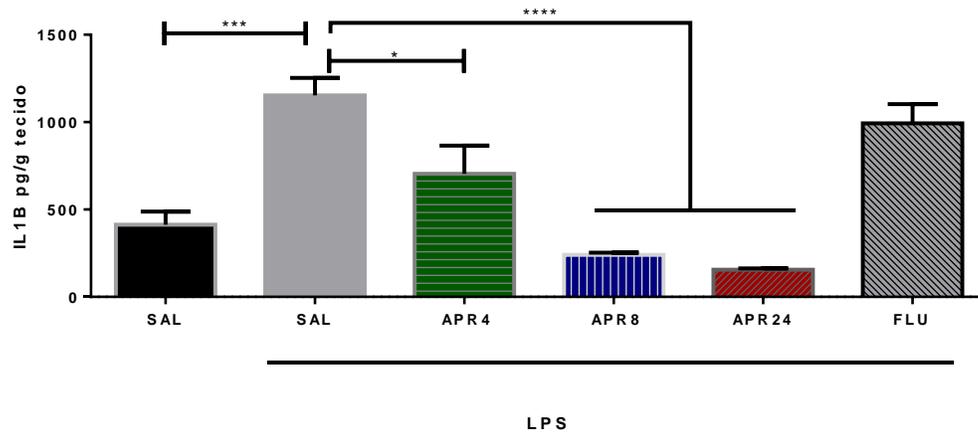
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de IL1 $\beta$  foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do IL1 $\beta$   $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IL1 $\beta$  (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Controle; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. LPS+SAL; \*\*\*  $p = 0,0001$  vs. LPS+SAL).

**Figura 24 – Alterações nas concentrações de IL1 $\beta$  induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de IL1 $\beta$  foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do IL1 $\beta$   $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IL1 $\beta$  (\*\* p= 0,0064 vs. Controle; \*\* p= 0,0019 vs LPS+SAL \*\*\*\* p<0,0001 vs. LPS+SAL; \*\* p=0,0011 vs LPS+SAL ).

**Figura 25 – Alterações nas concentrações de IL1 $\beta$  induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no corpo estriado de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de IL1 $\beta$  foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do IL1 $\beta$   $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IL1 $\beta$  (\*\*\*)  $p=0,0001$  vs. Controle; (\*)  $p=0,0291$  vs. LPS+SAL; (\*\*\*\*)  $p<0,0001$  vs. LPS+SAL).

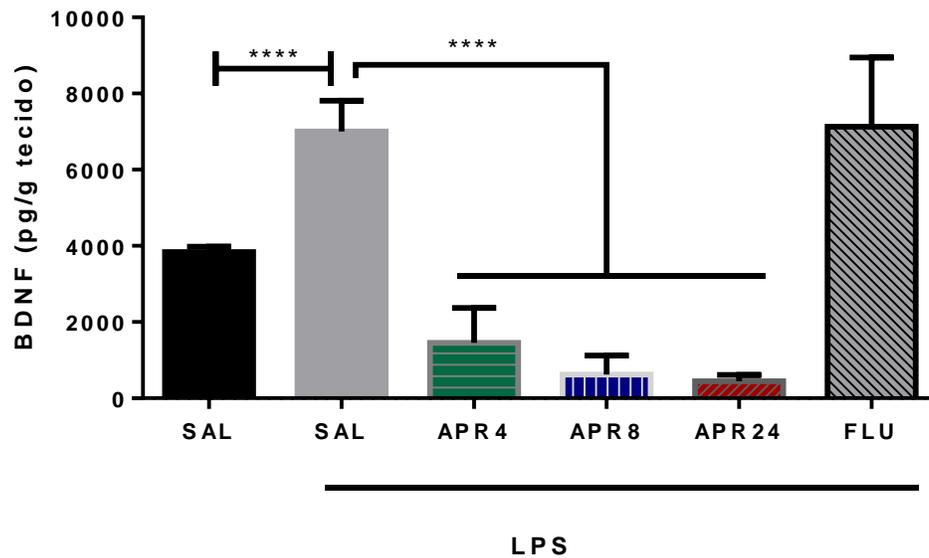
#### **6.4.4 Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de BDNF em áreas cerebrais de camundongos**

Após a indução do modelo de depressão com LPS e tratamento com as drogas, pode ser mensurada as concentrações de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) de camundongos.

No CPF (Figura 26), houve aumento significativo nas concentrações de BDNF no grupo LPS+SAL ( $p < 0,0001$ ) quando comparado com o grupo controle [ $F(5, 60) = 42,14, p < 0,0001$ ]. O tratamento com APR 4 ( $p < 0,0001$ ), APR 8 ( $p < 0,0001$ ) e APR24 ( $p < 0,0001$ ), diminuiu os níveis de BDNF quando comparado ao grupo LPS. A administração de FLU não demonstrou efeito significativo quando comparado com animais LPS + SAL.

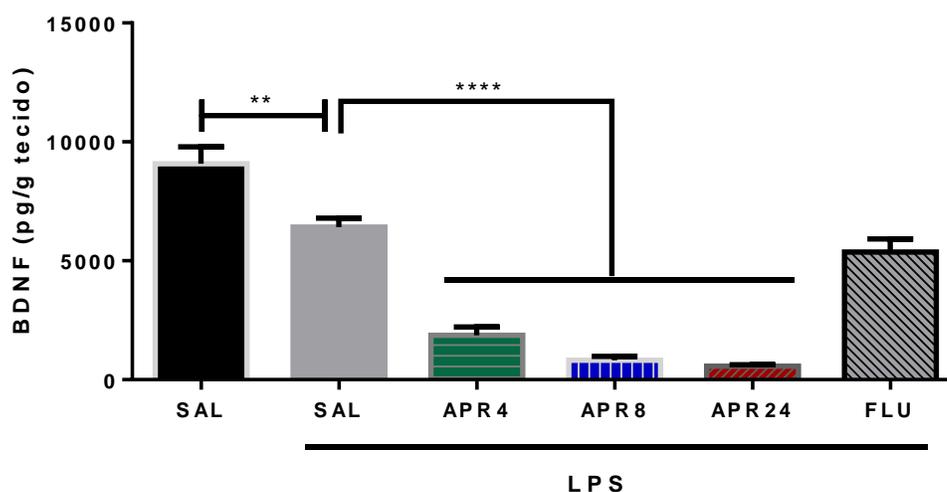
Diferente dos dados observados no CPF, no HC (Figura 27) o grupo LPS+SAL ( $p = 0,0012$ ) reduziu significativamente as concentrações de BDNF quando comparado com o grupo controle [ $F(5, 55) = 56,09, p < 0,0001$ ]. APR 4 ( $p < 0,0001$ ), APR 8 ( $p < 0,0001$ ) e APR24 ( $p < 0,0001$ ) não restaurou os níveis de BDNF, quando comparado ao grupo LPS+SAL. O grupo FLU não apresentou significância no aumento das concentrações de BDNF quando comparado ao grupo LPS. Entretanto, os valores encontrados no CE demonstram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo LPS ( $p > 0,9$ ) (Figura 28). O tratamentos com APR 4 ( $p < 0,0001$ ), APR 8 ( $p < 0,0001$ ) e APR24 ( $p < 0,0001$ ) não aumentou as concentrações de BDNF comparados ao grupo LPS+SAL. A administração de FLU ( $p = 0,0216$ ) também não alterou as concentrações de BDNF quando comparado ao grupo LPS.

**Figura 26 – Alterações nas concentrações de BDNF induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no córtex pré-frontal de animais tratados com administração intermitente de LPS**



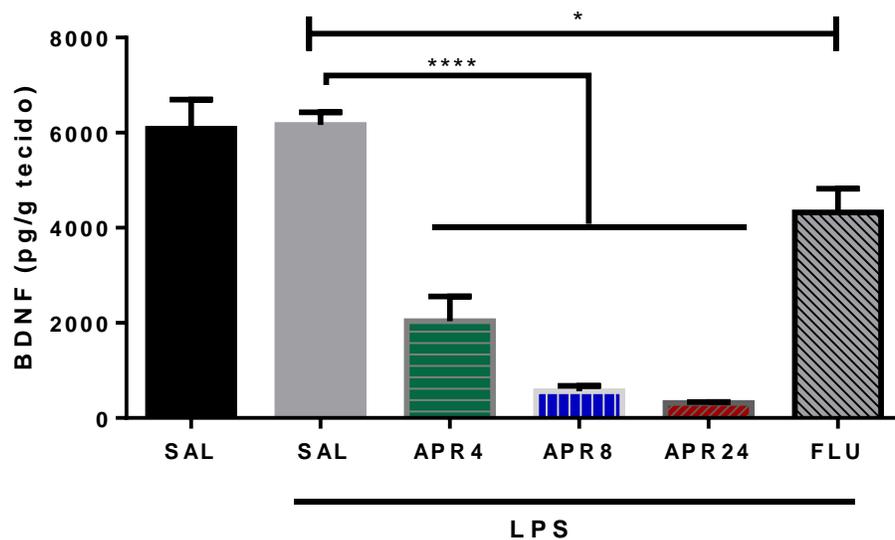
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8- animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de BDNF foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do BDNF  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de BDNF (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Controle; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. LPS+SAL).

**Figura 27 – Alterações nas concentrações de BDNF induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de BDNF foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do BDNF  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de BDNF (\*\*  $p=0,0012$  vs. Controle; \*\*\*\*  $p<0,0001$  vs. LPS+SAL).

**Figura 28 – Alterações nas concentrações de BDNF induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no corpo estriado de animais tratados com administração intermitente de LPS**

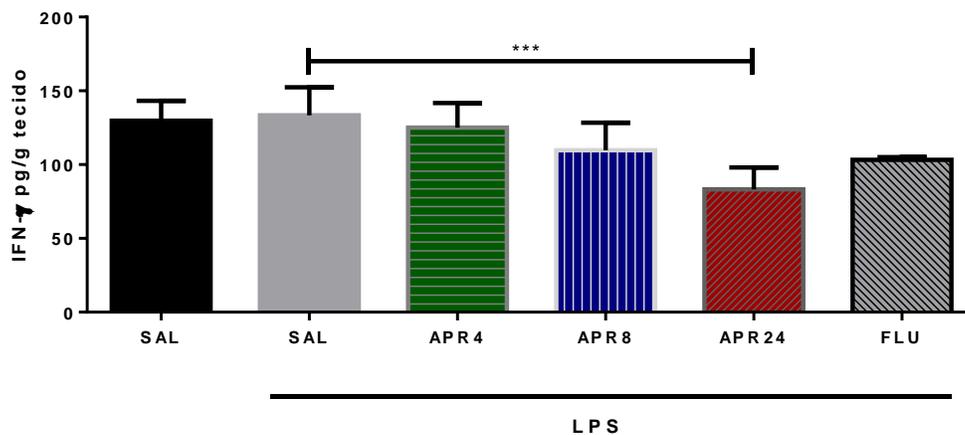


Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de BDNF foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do BDNF  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de BDNF (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. LPS+SAL; \*  $p = 0,0216$  vs. LPS+SAL)

#### **6.4.5 Efeito do tratamento com aprepitante e fluoxetina sobre as concentrações de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ no hipocampo de camundongos**

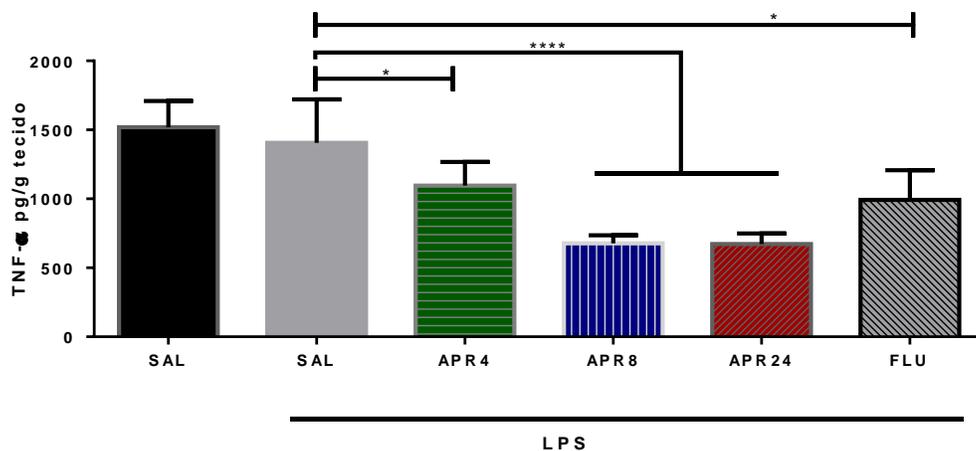
Não houve diferença significativa nos níveis de IFN- $\gamma$  no hipocampo entre o grupo controle e o grupo LPS + SAL (Figura 29). Os níveis de IFN- $\gamma$  no grupo APR 24 ( $p= 0,0005$ ) foram significativamente inferiores aos do grupo LPS +SAL. Padrão semelhante ao que foi evidenciado nas concentrações de IFN- $\gamma$ , também pode ser visto nos níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 30). Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo LPS+SAL, na região hipocampal. Entretanto, uma redução nas concentrações de TNF- $\alpha$ , pode ser visto em todos os grupos tratados quando comparados com o grupo LPS+SAL [ $F(5, 28) = 20,99, P < 0,0001$ ]. Nas doses de APR 4 ( $p= 0,0496$ ), APR 8 ( $p < 0,0001$ ) ou APR 24 ( $p < 0,0001$ ) houve redução nos níveis de TNF- $\alpha$ , quando comparadas ao grupo LPS. O grupo FLU ( $p= 0,0433$ ) também conseguiu reverter às concentrações aumentadas de TNF- $\alpha$  no hipocampo.

**Figura 29 – Alterações nas concentrações de IFN- $\gamma$  induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de IFN- $\gamma$  foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do IFN- $\gamma$   $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IFN- $\gamma$  (\*\*\*) p= 0,0005 vs. LPS+SAL).

**Figura 30 – Alterações nas concentrações de TNF- $\alpha$  induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de TNF- $\alpha$  foram mensuradas por ELISA. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do TNF- $\alpha$   $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de TNF- $\alpha$  (\*p= 0,0496 vs. LPS+SAL; \*\*\*\*p<0,0001 vs. LPS+SAL; \*p= 0,0433 vs. LPS+SAL).

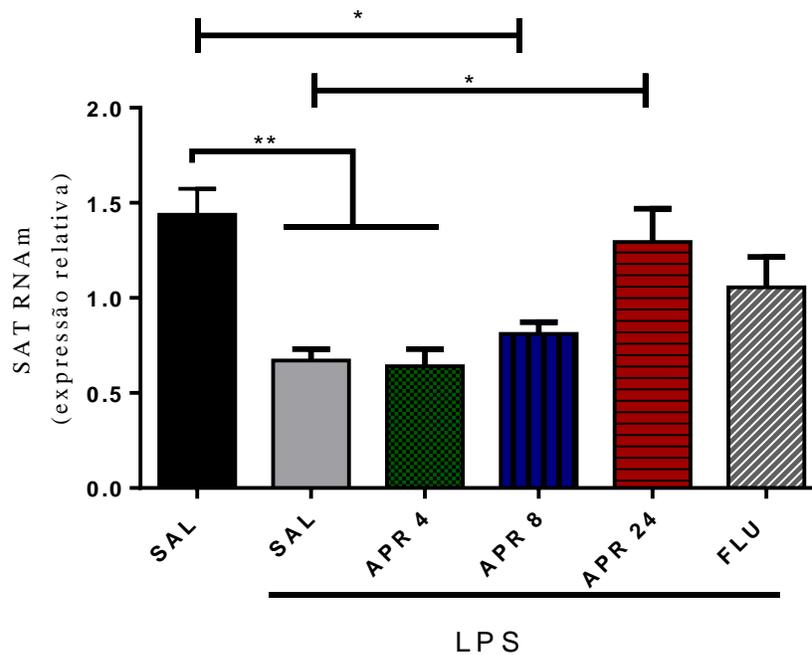
#### **6.4.6 Determinações da expressão genica de SAT-1, IDO-1 e TDO-2 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

De acordo com a análise estatística ANOVA de uma via, foi encontrada diferença significativa entre o grupo SAL e o grupo LPS + SAL quanto à expressão gênica de SAT-1 [F (5, 23) = 7,048; P = 0,0004] (Figura 31). O pós-teste de comparações múltiplas revelou diferenças basais nos níveis de expressão gênica entre os grupos com aumento significativo no grupo APR 24 quando comparado ao grupo LPS+ SAL (p= 0,0143). Entretanto os grupos APR4 (p= 0,0025) e APR8 (p= 0,0224) demonstraram redução significativa na expressão de SAT-1 quando comparados ao grupo SAL.

Na avaliação da expressão gênica de IDO-1 (Figura 32), houve aumento significativo dos níveis basais de RNAm no grupo LPS (p= 0,0002), APR4 (p= 0,0011) e APR8 (p= 0,0018) quando comparados ao controle [F (5, 26) = 8,483; P < 0,0001]. A dose de APR24 (p= 0,0086) mostrou uma diminuição nos níveis da expressão gênica de IDO-1 quando comparado ao grupo LPS+SAL. Nos animais tratados com FLU (p= 0,0476) a expressão gênica do RNAm de IDO-1 mostrou-se aumentada em relação ao grupo SAL.

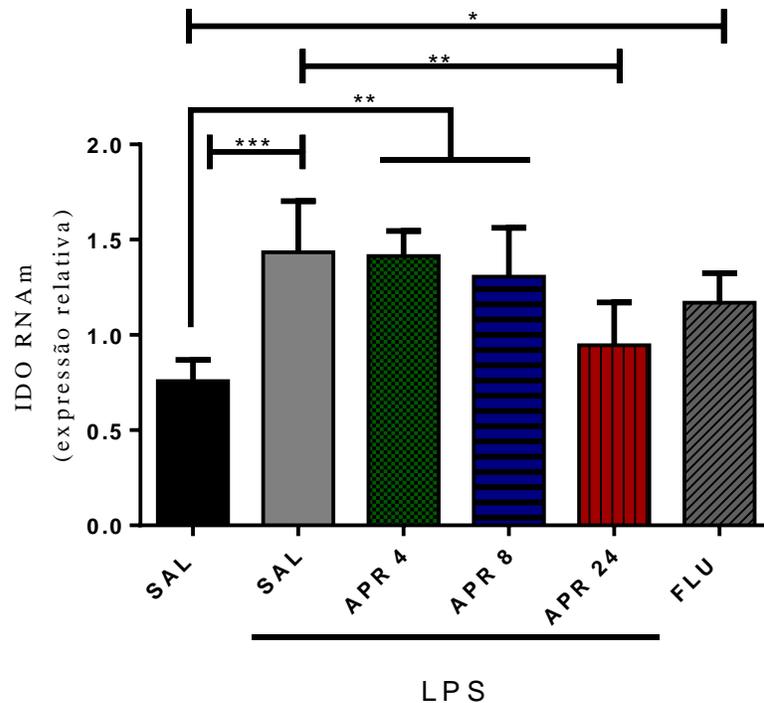
Os camundongos tratados com APR 24 (p= 0,0048) apresentaram um aumento na expressão gênica de TDO-2 quando comparados aos animais LPS (Figura 33). Entretanto os grupos SAL, APR 4, APR 8 e FLU não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo LPS+SAL.

**Figura 31 – Expressão gênica de SAT-1 por qPCR no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)**



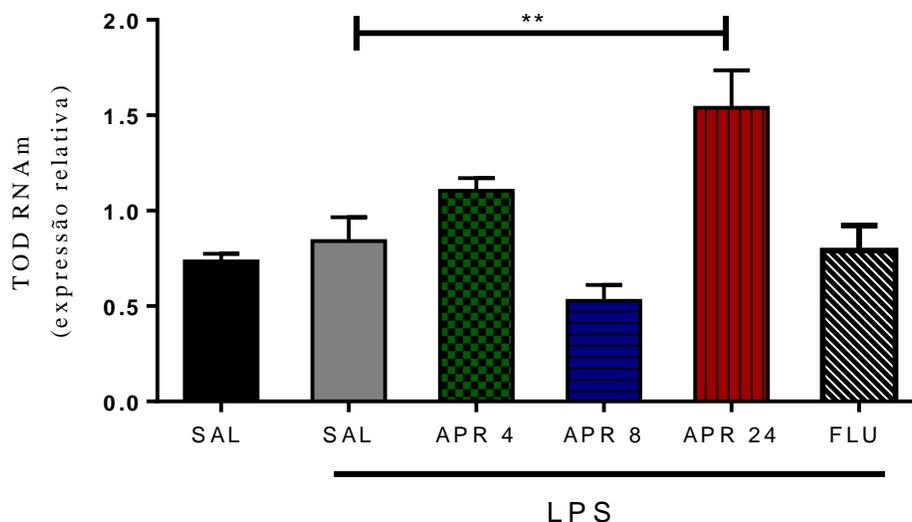
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de RNAm de SAT-1 hipocampal foram mensurados por qPCR. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do RNAm de SAT-1  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de SAT-1 (\*\*p= 0,0037 vs. Controle; \*p= 0,0025 vs. Controle; \*p= 0,0224 vs. Controle; \*p= 0,0143 vs. LPS+ SAL).

**Figura 32 – Expressão gênica de IDO-1 por qPCR no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de RNAm de IDO-1 hipocampal foram mensurados por qPCR. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do RNAm de IDO-1  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de IDO-1 (\*\* $p=0,0002$  vs. Controle; \*\* $p=0,0011$  vs. Controle; \*\* $p=0,0018$  vs. Controle; \*\* $p=0,0086$  vs. LPS+ SAL; \* $p=0,0476$  vs. Controle).

**Figura 33 – Expressão gênica de TDO-2 por qPCR no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS seguido pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg)**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de RNAm de TDO-2 hipocampal foram mensurados por qPCR. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do RNAm de TDO-2  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de TDO-2 (\*\* $p= 0,0048$  vs. LPS+SAL).

#### 6.4.7 Quantificações de Triptofano (TRP) e seus metabólitos por HPLC

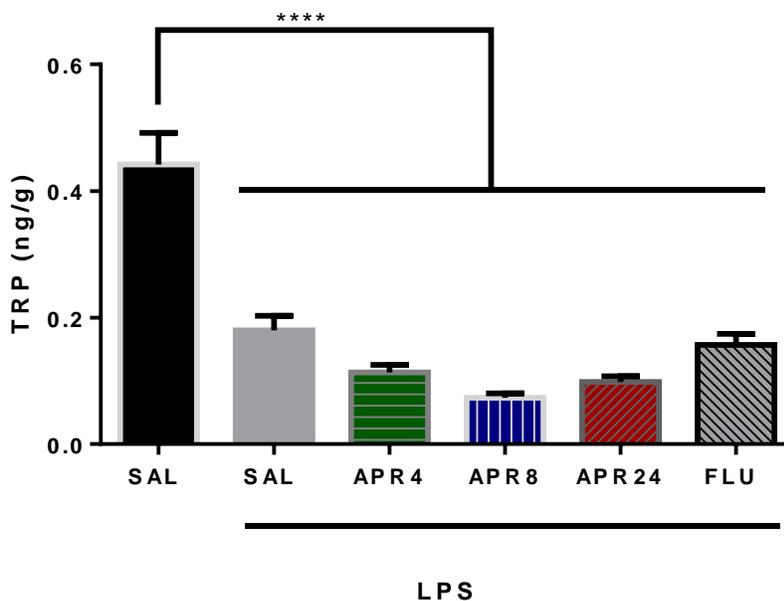
O grupo LPS+SAL mostrou níveis de TRP inferiores aos do grupo controle [F (5, 24) = 34,64; P < 0,0001]. Os grupos tratados com APR4 (p< 0,0001), APR8 (p< 0,0001) e APR 24 (p< 0,0001) e FLU (p< 0,0001) apresentaram redução nas concentrações de TRP quando comparados com o grupo SAL (Figura 34).

Seguindo a via de metabolização do TRP, a serotonina (5HT), um dos metabólitos formados a partir do TRP, apresentou-se reduzida no grupo LPS+SAL (p= 0,0255) quando comparada ao grupo SAL (Figura 35). Os grupos APR 8 (p= 0,0051) e APR 24 (p= 0,0061) também apresentaram redução nos níveis de 5HT comparados com o grupo controle.

A resposta inflamatória da cascata de metabolização do TRP que converte o mesmo em quinurenina (QUI) apresentou um aumento significativo no grupo LPS (p= 0,0395) quando comparado ao controle, como pode ser visto na Figura 36. Uma diminuição de QUI pode ser evidenciada tanto no grupo APR8 (p= 0,0046) quanto no grupo APR24 (p= 0,0082) quando comparado ao grupo LPS+SAL. Resposta semelhante não pode ser vista no grupo tratado com APR4 e FLU.

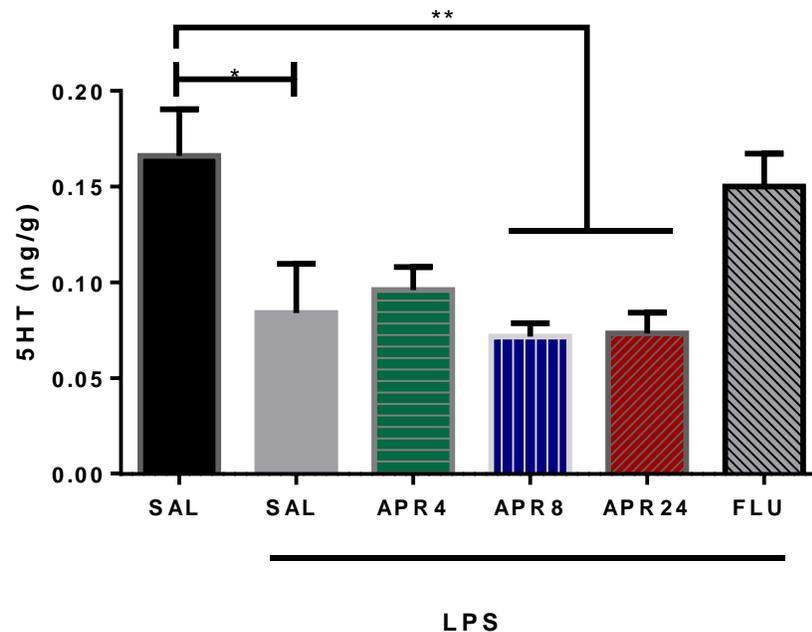
O ácido quinólico (AQ), importante metabólito excitatório originado a partir da metabolização da QUI, mostrou-se aumentado nos animais LPS+SAL (p= 0,0005) quando comparado ao controle [F (5, 29) = 11,99; P < 0,0001] (Figura 37). Uma redução significativa na concentração desse ácido pode ser observada em animais tratados com APR4 (p= 0,0029), APR8 (p< 0,0001) e APR24 ( p< 0,0004). O grupo tratado com FLU (p= 0,0006) não reduziu os níveis de AQ, mantendo concentração semelhante ao grupo LPS.

**Figura 34 – Alterações nas concentrações de triptofano (TRP) induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



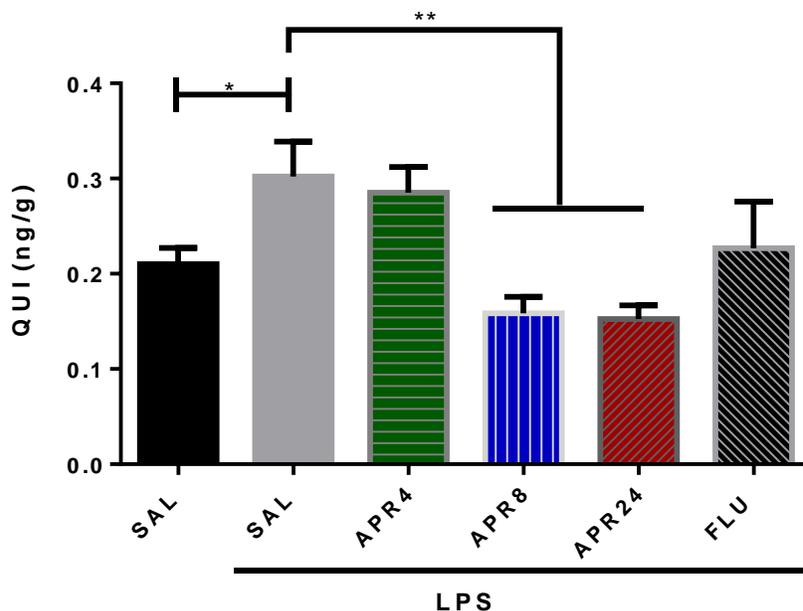
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de TRP foram mensuradas por HPLC. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do TRP  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de TRP (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Controle).

**Figura 35 – Alterações nas concentrações de serotonina (5HT) induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



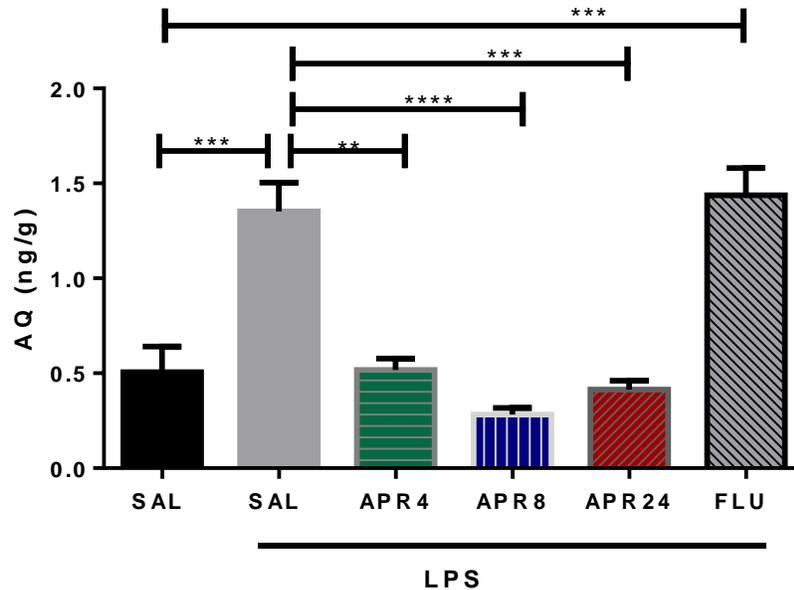
Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de 5HT foram mensuradas por HPLC. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do 5HT  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de 5HT ( \*p= 0,0255 vs. Controle; \*\*p= 0,0051vs. Controle, \*\*p= 0,0061vs. Controle).

**Figura 36 – Alterações nas concentrações de quinurenina (QUI) induzidas pela administração de aprepitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprepitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de QUI foram mensuradas por HPLC. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do QUI  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de QUI ( \*p= 0,0395 vs Controle; \*\*p= 0,0046 vs. LPS+SAL; \*\*p= 0,0082 vs. LPS+SAL).

**Figura 37 – Alterações nas concentrações de ácido quinolínico (AQ) induzidas pela administração de aprépitante (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no hipocampo de animais tratados com administração intermitente de LPS**



Camundongos receberam injeção i.p de LPS durante 4 meses para indução de depressão, em seguida foram divididos em grupos (8 animais por grupo) tratados com solução salina 0,9%, aprépitante (APR) (4, 8 e 24 mg/kg) e fluoxetina (FLU) (10 mg/kg) por 14 dias. Concentrações de AQ foram mensuradas por HPLC. Os animais do grupo controle (SAL) foram tratados apenas com salina 0,9% pelo mesmo período dos demais animais. As barras representam o valor percentual da média do AQ  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Concentrações de AQ ( \*\*\*  $p= 0,0005$  vs. Controle; \*\*  $p= 0,0029$  vs .LPS + SAL; \*\*\*\*  $p< 0,0001$  vs .LPS + SAL; \*\*\*  $p< 0,0004$  vs .LPS + SAL; \*\*\*  $p= 0,0006$  vs. Controle).

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, vimos que a administração intermitente de LPS durante quatro meses a camundongos fêmeas causou comportamento tipo depressão, evidenciado pelo teste do nado forçado, bem como anedonia, evidenciada pelo teste de preferência por sacarose. Nos parâmetros biomoleculares relacionados com as alterações comportamentais observamos aumento na expressão de Iba-1 (indicativo de ativação microglial), de NF- $\kappa$ B e dos níveis de IL1 $\beta$  no hipocampo. O aumento dos níveis de IL1 $\beta$  hipocampal relacionou-se com redução da transcrição de RNAm de SAT1, dos níveis de BDNF e aumento da expressão de transcritos de IDO relacionado a diminuição nos níveis de triptofano, aumento de quinurenina e de ácido quinolínico. O tratamento com aprepitante (APR), principalmente na mais alta dose utilizada, 24 mg/kg, foi capaz de reverter as alterações comportamentais tipo depressão e anedonia induzidas pelo LPS, com redução da ativação microglial e da expressão de NF- $\kappa$ B, conseqüente depleção de citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , redução de transcritos de IDO e aumento de RNAm de TDO e SAT1. O tratamento também levou a redução dos níveis de quinurenina e ácido quinolínico no hipocampo de camundongos. A fluoxetina (FLU) utilizada como antidepressivo padrão não reverteu a ativação microglial e neuroinflamação, assim como a quantidade de transcritos de SAT1 desencadeados pelo LPS. Esses resultados sugerem que o mecanismo do APR envolve redução na ativação da micróglia e conseqüente diminuição de marcadores inflamatórios. O APR pode vir a ser de grande valia no tratamento da depressão, agindo por mecanismos distintos dos antidepressivos usados na clínica como a FLU.

A administração de LPS simula uma inflamação no camundongo, situação na qual vias imunológicas são ativadas e é estabelecido um comportamento de doença, derivado do termo inglês *sickness behaviour*. Com a finalidade de resolver essa ameaça imunológica, o animal “tem que escolher” entre permanecer parado e descansar o corpo ou movimentar-se para procurar um lugar melhor e mais seguro para poder descansar (BASSI et al., 2012). O *sickness behaviour* é mais evidente aproximadamente duas horas após a administração de LPS, seguindo o pico de liberação de citocinas centrais e periféricas (DUNN; SWIERGIEL; DE BEAUREPAIRE, 2005), enquanto o comportamento depressão-símile e anedonia é observado 24 horas após o tratamento com LPS, ou seja, após o pico de liberação de citocinas (CUSTÓDIO et al., 2013). Esta linha temporal é observada quando da administração aguda de LPS 0,5 mg/kg.

Estudos mostram que o *sickness behaviour* tende a ser revertido 24 horas após o desafio com LPS quando o animal recupera a atividade locomotora a níveis semelhantes ao grupo controle, permanecendo apenas os fenótipos depressivos (CUSTÓDIO et al., 2013; FERREIRA MELLO et al., 2013), entretanto no nosso estudo, observamos maior duração desse comportamento de doença, evidenciado pela redução dos cruzamentos entre quadrantes no teste do campo aberto mesmo 24 horas após o desafio com LPS. Uma possível explicação seria a de que o modelo de LPS utilizado no presente estudo ter sido baseado na administração repetida e intermitente de LPS, um modelo novo de depressão. Por ser a primeira evidência desse quadro, estudos posteriores precisam ser realizados com a finalidade de estabelecer essa persistência do *sickness behaviour* no modelo crônico de depressão induzida por LPS.

Estudo prévio investigando os efeitos do LPS na indução de fenótipo de ansiedade relacionado à depressão não encontrou diferença significativa no tempo de permanência central no teste do campo aberto entre os grupos LPS e Controle (BASSI et al., 2012). Esse resultado está de acordo com os do presente estudo, por mais que a dose de LPS utilizada tenha variado de 10 a 200 µg/kg no estudo de Bassi e colaboradores e 750 a 1250 µg/kg no nosso trabalho.

A validação preditiva do modelo que nós utilizamos foi alcançada com o uso do inibidor seletivo da recaptção de serotonina, fluoxetina, que reverteu todas as alterações comportamentais em camundongos fêmeas induzidas pela administração de LPS, da mesma forma como foi observado previamente por MAES et al., 2013.

O tratamento com APR apresentou impacto positivo na recuperação da atividade locomotora. A administração de APR 4 mg/kg foi mais eficaz nesta reversão, embora a dose de 24 mg/kg também apresentasse redução no tempo de imobilidade quando comparado ao grupo LPS. Através dos mapas de trajetória no campo aberto, podemos observar que o tratamento com APR aumentou a atividade exploratória do animal dentro da arena, bem como os cruzamentos no quadrante central, semelhante ao observado nos animais tratados com FLU. Esse aumento na exploração e atividade no quadrante central da arena pode ser relacionado com uma possível atividade ansiolítica do APR. De fato, há diversos estudos mostrando a relação entre desordens depressivas e de ansiedade (BET et al., 2015), além de estudos pré-clínicos mostrando fenótipo ansiolítico resultante do antagonismo de receptores NK1 (CHAHL, 2006; ANDREWS, BOYCE, BRAIN et al., 2004).

Todas as doses de APR foram capazes de reverter os comportamentos depressão-símile, entretanto o tratamento com as doses de APR 8 mg/kg e APR 24 mg/kg foram as mais eficazes na reversão dos comportamentos tipo depressivos. No teste do nado forçado, APR 8 e APR24 diminuíram o tempo de imobilidade de maneira semelhante ao tratamento com FLU.

A anedonia é um dos sintomas principais da depressão (KUBERA et al., 2013b). Com a administração repetida de LPS foi possível induzir anedonia (redução no consumo de solução de sacarose) nos animais. As doses de APR 4 mg/kg, APR 8 mg/kg e APR 24 mg/kg aumentaram a preferência pela sacarose, revertendo este importante sintoma da depressão.

O sistema SP/NK1R e a neurotransmissão serotoninérgica têm sido associados à modulação de diversas respostas comportamentais (SANTARELLI et al., 2001). A elevação da transmissão serotoninérgica e o antagonismo de receptores NK1 já foram descritos como fatores que regulam ação ansiolítica e antidepressiva (CHAHL, 2006). O antagonismo de receptores NK1 pode exercer sua ação ansiolítica e antidepressiva por meio de modulação da atividade de neurônios noradrenérgicos no *locus ceruleo*, que por sua vez modulam a ação serotoninérgica. (SANTARELLI et al., 2001).

Estudos realizados em animais mostram que os antagonistas dos receptores NK1 aumentam a liberação de noradrenalina (NA) nos campos terminais do *locus cerúleo*, córtex pré-frontal e hipocampo (MILLAN et al., 2001; EBNER e SINGEWALD, 2007). Durante situações aversivas e estressantes a interação entre a via das taquicininas e a modulação noradrenérgica se mostra altamente ativa. Nesse contexto, o bloqueio do receptor NK1 parece atuar modulando negativamente a hiperativação da neurotransmissão de NA em situações de estresse (EBNER et al., 2004)

A substância P (SP) é um neuropeptídeo que desempenha um papel crucial na modulação das interações entre o sistema nervoso e o sistema imunológico. Evidências sugerem que a SP tende a aumentar respostas pró-inflamatórias a partir de uma ativação microglial (LAI et. al., 2000). Após ligação em receptores NK1 expressos na micróglia, essa taquicinina estimula a quimiotaxia, ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B bem como promove ativação de NADPH microglial promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio e neurotoxicidade (RASLEY et.al., 2002).

Resolvemos então investigar a ativação microglial através da expressão proteica de Iba-1, uma proteína de ligação ao cálcio específica da micróglia/macrófago que tem ação de fagocitose na micróglia ativada. Nossos resultados apontaram um significativo aumento da expressão proteica de Iba-1 em animais do grupo LPS em comparação ao grupo controle, sendo que os animais tratados com APR 24mg apresentaram uma redução considerável na expressão deste marcador de atividade microglial. Dessa forma pode-se sugerir que o bloqueio de receptores NK1, pelo APR pode diminuir a ativação de respostas inflamatórias melhorando o humor e aumentando a resposta ao tratamento da terapia antidepressiva (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009).

Considerando-se que receptores de NK-1 foram identificados em monócitos e macrófagos, a interação da SP com esses receptores promove a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e a produção de citocinas inflamatórias por SP (AMORUSO et al., 2008; BARDELLI et al., 2005; LOTZ; VAUGHAM; CARSON, 1998). O efeito de antagonismo dos receptores NK1 promovidos pelo APR nas doses de 4mg, 8mg e 24mg reduziu a expressão proteica de NF- $\kappa$ B no hipocampo de animais tratados com LPS, semelhante ao efeito da FLU. Esse resultado demonstra a capacidade do antagonismo de receptores NK1 em reduzir a liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo para a reversão dos comportamentos depressivos induzidos pela administração intermitente de LPS.

Alterações neuroendócrinas, modificações em fatores neurotróficos, anormalidades neuroimunes, incluindo ativação microglial, e aumento dos níveis circulantes de marcadores inflamatórios compõem a complexa fisiopatologia da depressão. Acredita-se que a exposição sistêmica a desafios inflamatórios, tal como o LPS, não só provoca inflamação, como também induz a uma neuroinflamação central, refletida por ativação da micróglia no cérebro, com produção cronicamente elevada de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (DANTZER, 2009).

Citocinas anti-inflamatórias, com a IL4, parecem atuar na regulação, na intensidade, e na duração do comportamento tipo depressivo, provavelmente pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias ou na atenuação da sinalização dessas citocinas. Entretanto, estudos sugerem que a IL4 pode apresentar ação pleitrópica por se ligar a diversos receptores, apresentando respostas diferentes (MIRE-SLUIJ, 1998; NELMS et al., 1999).

Um estudo realizado por Bluthé, *et al.* (2002) mostra que a IL-4 bloqueou o efeito depressivo do LPS, quando injetado 12h antes da endotoxina, quando administrada ao mesmo tempo que o LPS potenciou um comportamento de doença. Estes resultados mostram que a IL-4 pode ter efeitos pró ou anti-inflamatórios dependendo da sequencia de ativação.

Os resultados encontrados em nosso estudo mostraram não haver diferença significativa nas concentrações de IL4 entre os grupos controle e LPS no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE), o que pode ser explicado pelo intervalo de algumas semanas entre a última injeção de LPS e o tecido cerebral analisado. Draisma e colaboradores (2009) sugerem que uma possível tolerância ao LPS, desencadeada por administração repetida, produza uma ativação atenuada de vias imunoinflamatórias.

A dose de APR 4mg induziu um aumento considerável de IL4, nas três áreas analisadas, em relação aos outros tratamentos. Corroborando nossos resultados, os efeitos anti-inflamatórios de IL-4 podem ser explicados por uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias, pela inibição da transcrição nuclear de NF- $\kappa$ B, bem como pela ativação de uma resposta celular M2, caracterizando o fenótipo anti-inflamatório (CHAO *et al.*, 1993, GIAMPIETRI *et al.*, 2000; POUSSET *et al.*, 1999).

Os animais tratados com APR 8mg, APR 24mg e FLU não apresentaram aumento nas concentrações de IL4 quando comparados ao grupo LPS. No contexto da resposta inflamatória um baixo nível de IL4 pode se mostrar favorável, considerando que esta interleucina pode regular positivamente a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares e promover a ativação de respostas quimiotáticas potentes, promovendo o recrutamento precoce de células mononucleares a sítios de inflamação tecidual (GUNDEL *et al.* 1996). Esse efeito poderia contribuir para um comportamento de doença induzido por LPS, aumentando a resposta inflamatória cerebral em resposta ao LPS sistêmico, que costuma ser discreta.

Corroborando os resultados encontrados em nosso estudo sobre as concentrações de IL1- $\beta$ , Song e Wang (2011) afirmam que a administração sistêmica de LPS induz a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL1- $\beta$ , que tem sido relacionada à ativação microglial e alterações na neurotransmissão. Como pode ser observado nos resultados, os animais do grupo LPS apresentaram aumento significativo nas concentrações de IL1- $\beta$  em relação ao grupo controle no CPF,

HC e CE. Estudos mostram que a administração sistêmica ou central desta interleucina promove redução na atividade locomotora, fadiga e diminuição a resistência ao exercício em animais submetidos a esse modelo (CARMICHAEL et al., 2006; DANTZER et al., 2008).

As doses de APR4 mg/kg, APR8 mg/kg e APR24 mg/kg diminuíram as concentrações de IL1- $\beta$  nas 3 áreas cerebrais estudadas, mostrando efeito superior ao desempenhado pela FLU como controle positivo. O receptor NK1 parece ser responsável pela modulação de respostas imunoinflamatórias por meio de sua expressão em células como micróglia, monócitos e linfócitos (STEINHOF et al., 2014). Dessa forma, o antagonismo de receptores NK1, reduzindo a inflamação induzida pela administração de LPS pode ser um dos mecanismos da ação antidepressiva do APR.

Segundo Hashimoto (2009), alterações imunoinflamatórias promovem mudanças na homeostasia neuronal comprometendo a ação de fatores neurotróficos. O modelo animal de depressão induzido pela administração repetida de LPS causou alterações nos níveis de BDNF nas 3 áreas cerebrais estudadas.

Estudos afirmam que a administração de LPS resulta em significativa redução da expressão protéica e gênica de BDNF no hipocampo de ratos (RAETZ; WHITFIELD, 2002; LAPCHAK; ARAUJO; HEFTI, 1993). Entretanto a diminuição nas concentrações desse fator neurotrófico não é comum em todas as áreas cerebrais. Recentemente demonstrou-se que a inflamação induzida por LPS aumenta os níveis de BDNF na área tegumentar ventral e no núcleo acumbens, resultando em fenótipo tipo depressão em camundongos. Além disso, o aumento de BDNF prolongou a ativação da micróglia através de retroalimentação positiva (ZHANG, et. al., 2015).

Considerando-se que o CPF aumentou os níveis de BDNF no grupo LPS, o oposto foi evidenciado no HC. O tratamento com APR ou com FLU não aumentou os níveis de BDNF em nenhuma das áreas estudadas, fato que pode ser justificado por uma possível não detecção do BDNF maduro. Estudos têm associado a diminuição de BDNF maduro no prosencéfalo de camundongos com atenuação das ações dos antidepressivos, bem como inibição na sinalização de TrkB (receptor de ligação do BDNF), por vias inflamatórias, no cérebro de camundongos promovendo redução nas respostas antidepressivas (MONTEGGIA et al., 2004; SAARELAINEN et al., 2003; MONTEGGIA et al., 2007)

De fato, em modelos animais, a administração de indutores de citocinas pró-inflamatórias ou LPS podem resultar em supressão acentuada da neurogênese hipocampal (KOO e DUMAN, 2008). Considerando-se esses dados, resolvemos investigar detalhadamente as possíveis alterações de mediadores inflamatórios no hipocampo de camundongos submetidos à administração repetida de LPS. Nossos resultados não mostraram diferença significativa nos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre os grupos controle e LPS. Dado semelhante foi encontrado por Kubera *et al.*; (2013) que observou em camundongos fêmeas submetidas a administrações intermitentes de LPS, diminuição ou nenhuma alteração nas concentrações de IFN- $\gamma$ . Nosso achado pode ser explicado pelo intervalo de tempo entre a última injeção de LPS e a análise do tecido cerebral algumas semanas depois. Portanto, não podemos excluir que durante ou logo após as administrações de LPS tivesse ocorrido aumento de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$ , já que o TNF- $\alpha$  categoriza-se como uma das principais citocinas de reação em fase aguda.

Considerando-se um perfil anti-inflamatório do APR, a dose de 24 (mg/kg) mostrou redução importante nos níveis de IFN- $\gamma$ . O mesmo foi observado nas concentrações de TNF- $\alpha$  nas três doses utilizadas na pesquisa. Em estudo anterior demonstrou-se que a substância P, a neuroquinina A e agonistas de NK-1 e NK-2 estimulam a maior liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em monócitos de pacientes depressivos, fato que se reverte após utilização de antagonistas de NK-1 / NK-2 (BARDELLI *et al.*, 2013).

Evidências sugerem que o transtorno depressivo maior acompanha-se de contagens elevadas de monócitos e níveis de TNF- $\alpha$  (KIM *et al.*, 2007; SEIDEL *et al.*, 1996). Além de serem amplamente reconhecidos como os produtores mais eficientes de citocinas inflamatórias, no início dos anos 90, os monócitos foram sugeridos como determinantes na patogênese da depressão maior (MAES; SMITH; SCHARPE, 1995).

Estudos associam a depressão maior a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, a um maior número de monócitos circulantes e à ativação microglial no cérebro de vítimas de suicídio (PADMOS *et al.*, 2009; STEINER *et al.*, 2008). Citocinas inflamatórias tais como IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  mostram-se elevadas em pacientes com comportamento suicida (JANELIDZE *et al.*, 2011; INSUNG *et al.*, 2012). Entretanto, com base na literatura atual, é impossível apontar categoricamente as citocinas inflamatórias que servem de marcadores úteis no suicídio.

Por outro lado, evidências recentes sugerem que outras vias moleculares, tais como a neurotransmissão glutamatérgica e o sistema de resposta ao estresse de poliaminas, podem estar relacionados ao suicídio (FIORI e TURECKI, 2010; FIORI et. al., 2011). Estudos têm afirmado que um déficit relacionado a espermidina / espermina N-1 acetiltransferase (SAT1), enzima limitante da taxa de catabolismo de poliaminas em resposta ao estresse, aparece em vários cérebros de suicidas (SEQUEIRA et. al., 2006).

Considerando esses dados, investigamos a expressão gênica de SAT-1 em nosso modelo. Essa enzima se mostrou diminuída em animais do grupo LPS em comparação ao grupo controle. Achados semelhantes foram apontados por outros pesquisadores, que relataram uma expressão reduzida de SAT1 e espermina oxidase (SMOX) em cérebro de pacientes com depressão maior que tentaram o suicídio. Alterações na expressão da taxa de enzimas do metabolismo das poliaminas também puderam ser evidenciadas nesses pacientes (SEQUEIRA et. al., 2006; FIORI et. al., 2009; GUIPPONI et. al., 2009; FIORI e TURECKI, 2010; SEQUEIRA et. al., 2007; KLEMPAN et. al., 2009).

A administração de APR 24mg promoveu um aumento significativo na expressão gênica de SAT-1 quando comparada ao grupo LPS. Sabendo que uma infra regulação de SAT-1 está relacionada ao comportamento de suicídio (SEQUEIRA et al., 2006, FIORI et al., 2009), sugerimos que a ação do APR pode contribuir para uma melhora dos sintomas depressivos e conseqüentemente, redução da ideação suicida.

A via das quinureninas também tem sido implicada no risco de suicídio. Segundo Sublette, *et. al.* (2011) dentre os pacientes com distúrbio depressivo maior, níveis mais elevados de quinurenina (QUI) plasmática puderam ser evidenciados naqueles que tentaram suicídio quando comparado aos que não tentaram.

No modelo utilizado no presente estudo uma consequência importante da liberação de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS, e que é relevante para a progressão da depressão, é a estimulação da indolamina 2, 3 dioxigenase (IDO). A IDO ativada metaboliza o triptofano (TRP), o aminoácido precursor de serotonina (5-HT), em QUI (PARK et al., 2011). As células de micróglia expressam a quinurenina-3-monooxigenase (KMO), enzima responsável pela conversão de QUI em ácido quinolínico (AQ), um agonista do receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato (NMDA),

enquanto que os astrócitos expressam quinurenina aminotransferase (KAT) que metaboliza QUI em ácido quinurênico, importante antagonista do receptor NMDA (CORONA et al., 2010).

Nesse contexto, investigamos o efeito do APR na via de metabolização do TRP. Uma redução nas concentrações de TRP foi vista nos grupos que foram submetidos à administração de LPS em comparação ao grupo controle. A resposta neuroinflamatória desenvolvida a partir da redução dos níveis de TRP circulantes e aumento, concomitante, nas concentrações de seus metabolitos no líquido cefalorraquidiano pode influenciar o desenvolvimento de alterações de humor e comportamento do tipo depressivo em pacientes (GLASER e KIECOLT-GLASER, 2005; MYINT et al., 2007; RAISON et al., 2010; CAPURON e MILLER, 2011).

Guo *et al.* (2016) mostraram que a administração repetida de LPS não produz aumento significativo no conteúdo cerebral de TRP. Isso pode ser explicado pelo fato de que o processo inflamatório sistêmico pode tanto induzir a atividade de IDO no cérebro quanto na periferia, o que diminui a concentração de TRP circulante e reduz a biodisponibilidade de TRP no cérebro. Em apoio a essa teoria, um estudo recente observou uma redução significativa de TRP no plasma de camundongo 72 h após a injeção de LPS (CORONA et al., 2013).

Corroborando a diminuição de TRP, encontramos níveis reduzidos de 5-HT nos animais do grupo LPS comparado ao grupo SAL. Estes achados sugerem que o comprometimento do TRP induzindo depleção na neurotransmissão serotoninérgica pode ser responsável pelos comportamentos de depressão após a ativação imunológica persistente.

Os animais tratados com APR 8 e APR 24 também apresentaram redução nos níveis de 5HT. Possivelmente, devido ao desafio imune, e conseqüente redução dos níveis de TRP o uso do antagonista de NK1 não influenciou no aumento das concentrações de 5HT. Acreditamos que esse fato pode estar relacionado à formação de outros metabólitos da via de biotransformação do TRP.

Evidências sugerem a presença de receptores NK1 em neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos, propondo uma influência direta da SP sobre a atividade desses neurônios (BERTON; NESTLER, 2006). Estudos eletrofisiológicos comprovaram que o bloqueio dos receptores NK1, quer por tratamento com antagonista ou por alteração genética, aumenta o disparo de neurônios no núcleo da rafe, promovendo aumento na neurotransmissão serotoninérgica (GOBBI; BLIER, 2005). Com base nesses achados, é proposto que os efeitos antidepressivos dos antagonistas dos

receptores NK1 podem resultar, em alguns casos, no aumento da transmissão central de 5-HT semelhante à dos antidepressivos estabelecidos, como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), desenvolvendo efeitos terapêuticos mais rápidos, porque não agem somente atenuando a resposta de autoreceptores (GOBBI et al., 2007)

O uso de fluoxetina fez com que os níveis de 5HT se mantivessem semelhantes aos do grupo controle, efeito esperado devido ao próprio mecanismo de ação da FLU (inibidor seletivo da recaptação de serotonina).

A queda nos níveis plasmáticos de TRP que ocorre em pacientes depressivos está relacionada à ativação das principais enzimas que o metabolizam, a triptofano 2,3 dioxigenase (TDO) e a IDO. Ambas agem degradando o TRP ao longo da via das quinureninas.

A ativação de receptores TLR-4 por LPS aumenta os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , INF- $\gamma$ ) em camundongos e ativa potentemente a IDO, tanto na periferia como no cérebro (WIDNER, et. al., 1997). No presente trabalho, a expressão gênica de IDO mostrou-se aumentada nos animais do grupo LPS em comparação ao grupo controle resultado que vai ao encontro da hipótese de que a ativação imune pode induzir a atividade de IDO, que converte TRP em QUI, esgota TRP e reduz a concentração de 5-HT, o que contribui para a progressão da depressão (GODBOUT et al., 2008).

Uma redução na expressão gênica de IDO pôde ser evidenciada no grupo tratado com APR 24 mg. Como citado anteriormente, sabe-se que a interação da SP com receptores NK-1 na micróglia pode aumentar significativamente a produção de citocinas inflamatórias após exposição a agentes patogênicos bacterianos (CHAUHAN et al., 2008). As citocinas então liberadas promovem estimulação da IDO, desencadeando ativação da via das quinureninas e consequentes efeitos inflamatórios. Em contrapartida, o uso de antagonistas de receptor NK-1 tem atenuado a inflamação no SNC, promovendo uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias em infecção por *S. pneumoniae* (MUÑOZ; COVEÑAS, 2013). Além disso, a intervenção terapêutica com antagonistas de NK-1 tem impedido a gliose associada à infecção e desmielinização no SNC (CHAUHAN et al., 2011). O bloqueio da interação da SP com o receptor NK-1 pode ser um excelente estratégia para redução da ativação da IDO e consequente tratamento da neuroinflamação.

Diferentemente da IDO a ação da TDO não é ativada por citocinas inflamatórias e sim por glicocorticóides, pelo triptofano, glucagon e estrogênios (NAKAMURA et al., 1980). Em nossos resultados, a expressão gênica dessa enzima só mostrou-se aumentada nos animais tratados com APR24. Segundo Chiang *et al.* (2013) a regulação positiva de TDO e o *down regulation* da KMO, enzima importante para formação de AQ, estão envolvidos em resposta ao um efeito anti-inflamatório.

Após a ativação das enzimas, o principal metabólito formado a partir do TRP é a QUI, essa é facilmente transportada através da barreira hematoencefálica para o cérebro, onde pode ser metabolizada em células como macrófagos, micróglia e astrócitos gerando compostos neuroativos. A QUI é degradada ao longo de um dos dois ramos catabólicos da via, levando à formação de 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e AQ ou ácido quinurênico (SCHWARCZ, 2004).

No presente estudo, evidenciamos um aumento nas concentrações de QUI no grupo LPS em comparação ao grupo SAL. O aumento decorre da diminuição de TRP/ 5-HT e do aumento da expressão gênica de IDO. O'Connor *et al.* (2009) observaram que a administração de QUI induz um estado de depressão em ratos. Nesta mesma linha, Corona e colaboradores (2010) demonstraram que a administração aguda ou repetida de LPS aumenta notavelmente a formação de QUI no sistema nervoso central.

As doses de APR 8 e 24 mg/kg reduziram os níveis de QUI quando comparada ao grupo LPS. Esse fato mostra um potencial perfil anti-inflamatório do APR promovendo uma redução na ativação da via e na produção de seus metabólitos.

Evidências sugerem que o desequilíbrio ocasionado pela inflamação sistêmica não só induz a formação de QUI como também aumenta a síntese de AQ causando ativação do receptor NMDA e neurotoxicidade (ZHENG et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que a administração de LPS induz a expressão de KMO, a enzima responsável pela conversão de QUI em AQ (Connor et al., 2008; Molteni et al., 2013). Nossos resultados estão de acordo com esses achados. Apesar de não termos conseguido mensurar o ac. quinurênico inferimos que a transformação QUI tenha sido desviada para o lado de formação do AQ composto neurotóxico, enquanto que o lado de neuroproteção do ácido quinurênico foi comprometido.

Sabendo que o AQ é um importante agonista NMDA, acreditamos que os comportamentos do tipo depressivo induzidos por LPS são mediados pela ativação desse receptor. Uma vez que a sinalização do NMDA é amplificada, pode ocorrer uma exacerbação do processo inflamatório e neurodegenerativo (CHAO et al., 1995). O simultâneo aumento da secreção de glutamato e a desregulação de QUI encontrada em ratos após administração aguda e repetida de LPS pode constituir um ciclo vicioso que desempenha um papel importante nas alterações comportamentais associadas à inflamação (GUO et al., 2016).

O tratamento com o antagonista de NK-1 reduziu as concentrações de AQ nas três doses utilizadas no estudo. A diminuição nos níveis de AQ promove uma redução na disfunção mitocondrial e geração de radicais livres (BORDELON et al., 1997; SANTAMARIA et al., 2001). Além da íntima relação entre SP e o sistema monoaminérgico, estudos pré-clínicos mostram que o antagonismo de receptores NK1 é capaz de reduzir a liberação do neurotransmissor excitatório glutamato, amenizando os efeitos deletérios consequentes da exacerbação de sua ação (GARCIA-RECIO; GASCÓN, 2015; JURÁNEK; LEMBECK, 1997).

Como visto anteriormente, o LPS aumenta a expressão da enzima IDO que, por sua vez, converte o TRP a AQ, agonista de receptores NMDA, que atua através do aumento da liberação de glutamato e inibição da recaptação desse neurotransmissor por astrócitos, elevando sua concentração no microambiente, causando neurotoxicidade (BARANYI et al., 2015; LUGO-HUITRÓN et al., 2013). A capacidade do antagonismo de receptores NK1 em reduzir a liberação de glutamato pode ser outro mecanismo que contribui para a reversão dos comportamentos depressivos induzidos pela administração intermitente de LPS.

Os inibidores da recaptação de serotonina parecem não exercer efeito importante mediante as respostas neuroinflamatórias. Corroborando com os nossos achados, em pesquisa feita com 63 pacientes diagnosticados com depressão e tratados com fluoxetina 20 mg por 6, 12 e 18 semanas, não foi observada alteração nos níveis plasmáticos de TRP, QUI e ácido quinurênico (MACKAY et al., 2009). Esse mesmo estudo mostrou também que não houve diferença significativa entre níveis de BDNF, proteína C reativa e IL-2 nos pacientes tratados com fluoxetina.

Visando à melhoria no tratamento para depressão e transtornos de ansiedade, o sistema de neuropeptídios apresenta-se como um bom alvo terapêutico. Como os neuropeptídios possuem

localizações neuroanatômicas mais discretas em relação às monoaminas, espera-se que os compostos antagonistas de seus receptores apresentem alteração fisiológica relativamente menor e, por conseguinte, menos efeitos colaterais (HOLMES et al., 2003). Além disso, esses fármacos podem funcionar como terapia adjuvante que acelera e /ou potencializa os efeitos anti-depressivos estabelecidos, em particular pelos inibidores da recaptção de serotonina, contribuindo para uma melhora mais rápida dos sintomas e maior adesão do paciente ao tratamento.

Apesar de resultados promissores tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos, ainda é preciso que sejam estabelecidos perfis de eficácia, segurança e tolerabilidade dos fármacos que têm como alvo os neuropeptídios, bem como o entendimento da modulação farmacológica da via das taquicininas no perfil de expressão de seus receptores em células neuronais e não neuronais (micróglia e astrócitos) em áreas cerebrais do sistema límbico e cortical relacionado com a depressão.

Ainda que a depressão acometa mais mulheres do que homens, fato que justifica a utilização de animais fêmeas no estudo, na maioria dos transtornos de humor, o dimorfismo sexual é um fator relevante para fenótipo desses transtornos, sendo interessante também avaliar esse modelo de administração repetida de LPS no comportamento e alterações biomoleculares em animais machos. Considerando as limitações do presente estudo, acreditamos que pesquisas posteriores ampliarão a compreensão das vias de taquicininas na fisiopatologia e tratamento da depressão.

**Quadro 2 – Representação esquemática dos efeitos de APR4, APR8, APR 24 e FLU sobre os testes comportamentais**

<b>ATIVIDADE LOCOMOTORA</b>	<b>SAL</b>	<b>LPS</b>	<b>APR4</b>	<b>APR8</b>	<b>APR24</b>	<b>FLU</b>
<b>CRUZAMENTO ENTRE QUADRANTES</b>	↑	↓	↑*	↔	↔	↑*
<b>IMOBILIDADE</b>	↓	↑#	↓*	↓*	↓*	↓*
<b>PERMANÊNCIA NO QUADRANTE CENTRAL</b>	↔	↔	↔	↑*	↑*	↑*
<b>RAZÃO LOCOMOÇÃO CENTRAL/TOTAL</b>	↔	↔	↔	↔	↑*	↑*
<b>NADA FORÇADO TEMPO DE IMOBILIDADE</b>	↓	↑#	↔	↓*	↓*	↓*
<b>PREFERÊNCIA POR SACAROSE</b>	↑	↓#	↑*	↑*	↑*	↑*

Fonte: Elaborado pela autora. Grupos comparados com o Controle (#), LPS (\*) ou APR4 (a). Déficit ou diminuição (↓); melhora ou aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (↔).

**Quadro 3 - Representação esquemática dos efeitos de APR4, APR8, APR 24 e FLU sobre os testes biomoleculares e neuroquímicos**

TESTES BIOMOLECULARES E NEUROQUÍMICOS	SAL	LPS	APR4	APR8	APR24	FLU
Iba-1- HC	↓	↑ #	↔	↔	↓ *	↔
NF-kB- HC	↓	↑	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
IL4- PF	↔	↔	↑ #*	↓ a	↓ a	↓ a
IL4- HC	↔	↔	↑ #*	↓ a	↓ a	↓ a
IL4-CE	↔	↔	↑ #*	↓ a	↓ a	↓ a
IL-1β- PF	↓	↑ #	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
IL-1β- HC	↓	↑ #	↓ *	↓ *	↓ *	↔
IL-1β- CE	↓	↑ #	↓ *	↓ *	↓ *	↔
BDNF – PF	↓	↑ #	↓ *	↓ *	↓ *	↔
BDNF- HC	↑	↓ #	↓ #	↓ #	↓ #	↔
BDNF- CE	↔	↔	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *

IFN- $\gamma$ - HC					*	
TNF- $\alpha$ - HC			*	*	*	*
SAT-1 – HC		#	#	#	*	
IDO-1 – HC		#	#	#	*	#
TDO-HC					*	
TRP- HC		#	#	#	#	#
QUI- HC		#		*	*	
AQ- HC		#	*	*	*	*

Fonte: Elaborado pela autora. Grupos comparados com o Controle (#), LPS (\*) ou APR4 (a). Déficit ou diminuição (); melhora ou aumento (); ausência de efeitos estatisticamente significantes ().

## 8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o APR, na forma de monoterapia, pode ser uma ferramenta importante para o tratamento das depressões relacionadas à neuroinflamação, uma vez que este foi capaz de reverter às alterações comportamentais compatíveis com a depressão (anedonia e imobilidade no teste do nado forçado). Corroborando os nossos resultados comportamentais, os resultados bioquímicos, referentes a importantes marcadores inflamatórios, mostraram-se aumentados nos animais do grupo LPS defendendo a teoria de que a neuroinflamação induz alterações comportamentais e de humor. Este fato foi revertido pelo tratamento com APR, principalmente na dose de 24 mg, que mostrou eficácia reduzindo citocinas pró-inflamatórias, diminuindo a ativação da via das quinureninas bem como suprimindo a expressão de marcador importante para o suicídio.

Acreditando na eficácia dos antagonistas de NK1 como um potencial foco terapêutico para tratamento de transtornos com base neuroinflamatória, consideramos que estudos complementares precisam ser realizados para compreendermos melhor os mecanismos de interação entre o sistema da substância P e seu receptor NK1, a neurotransmissão monoaminérgica e glutamatérgica, bem como identificar como as bases biomoleculares do mecanismo de ação do APR podem atuar na reversão dos sintomas depressivos em ambos os sexos.



## 9 REFERÊNCIAS

- AAN HET, ROT. M. et al. Safety and efficacy of repeated-dose intravenous ketamine for treatment-resistant depression. **Biol Psychiatry**; v. 67, p. 139–45, 2010.
- ADZIC, M. et al. The contribution of hypothalamic neuroendocrine, neuroplastic and neuroinflammatory processes to lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in female and male rats: Involvement of glucocorticoid receptor and C/EBP- $\beta$ . **Behavioural Brain Research**, v. 291, p. 130–139, 2015.
- ALLISON, D. J.; DITOR, D. S. The common inflammatory etiology of depression and cognitive impairment: a therapeutic target. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 151, 2014.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Fifth ed. Washington, DC: British Library, 2014.
- AMORUSO, A. et al. A novel activity for substance P: stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  protein expression in human monocytes and macrophages. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p.144–52, 2008.
- ANDREWS, S. et al. **Tachykinins**. Graz, Áustria: Springer, v. 11, 2004.
- AONURM-HELM, A. et al. NCAM-deficient mice show prominent abnormalities in serotonergic and BDNF systems in brain - Restoration by chronic amitriptyline. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, 21 out. 2015.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- AYDEMIR, O.; DEVECI, A.; TANELI, F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 261–5, mar. 2005.
- BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, p. n/a–n/a, 2015.
- BARANYI, A. et al. Quinolinic Acid Responses during Interferon- $\alpha$ -Induced Depressive Symptomatology in Patients with Chronic Hepatitis C Infection - A Novel Aspect for Depression and Inflammatory Hypothesis. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. e0137022, 2015.
- BARDELLI, C., et al. Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF- $\kappa$ B pathway. **British Journal of Pharmacology**, v.145, p.385–96, 2005.

- BARDELLI, C. et al. Recurrent major depressive disorder: imbalance of neurokinin (NK)-1 and NK-2 receptor expression in monocytes. **Pharmacol Res**, v. 68, p.24–30, 2013.
- BARR, A. M.; MARKOU, A. Psychostimulant withdrawal as an inducing condition in animal models of depression. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 675–706, jan. 2005.
- BASSI, G. S. et al. Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behaviour Evaluated in Different Models of Anxiety and Innate Fear in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 4, p. 359–369, 2012.
- BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.
- BELZUNG, C.; WILLNER, P.; PHILIPPOT, P. Depression: from psychopathology to pathophysiology. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 30, p. 24–30, 2015.
- BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major Depression. **The Medical clinics of North America**, v. 98, n. 5, p. 981–1005, 2014.
- BERLIM, M.T.; TURECKI, G. What is the meaning of treatment resistant refractory major depression (TRD)? A systematic review of current randomized trials. **European Neuropsychopharmacology**, v.17, p.696-707, 2007.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137–151, 2006.
- BET, P. M. et al. Current and remitted depression and anxiety disorders as risk factors for medication nonadherence. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 76, n. 9, p. e1114–21, set. 2015.
- BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 3, p. 261–71, jun. 2001.
- BLUTHÉ, M. R. et al. Dual effect of central injection of recombinant rat interleukin-4 on lipopolysaccharide- induced sickness behavior in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p.87-93, 2002.
- BONDY, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 7–20, 2002.
- BORDELON, Y.M. et al. Energetic dysfunction in quinolinic acidlesioned rat striatum. **J. Neurochem.** v.69, p.1629–1693, 1997.
- BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 90, 2011.
- CAMPBELL, B. M. et al. Kynurenines in CNS disease: Regulation by inflammatory cytokines.

**Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 8 FEB, p. 1–22, 2014.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 35 Suppl 2, p. S101–11, 2013.

CANLI, T. Reconceptualizing major depressive disorder as an infectious disease. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 4, n. 1, p. 10, 2014.

CAPURON, L.; MILLER, A.H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacol. Ther.** v.130, p. 226—238, 2011.

CARMICHAEL, M. D. et al. Role of brain IL-1beta on fatigue after exercise-induced muscle damage. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v.291, p.344–1348, 2006.

CARVALHO, H. W. DE et al. The joint structure of major depression, anxiety disorders, and trait negative affect. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 36, n. 4, p. 285–92, jan. 2014.

CHADMAN, K. K.; YANG, M.; CRAWLEY, J. N. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 150, n. 1, p. 1–11, 2009.

CHAHL, L. A. Tachykinins and neuropsychiatric disorders. **Current drug targets**, v. 7, n. 8, p. 993–1003, 2006.

CHAO, C.C. et al.. Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of Nmethyl- D-aspartate receptors. **Brain Behav. Immun.** v.9, p. 355–365, 1995.

CHAO, C.C.; MOLITOR, T.W.; HU, S. Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. **J Immunol**, v. 151, p. 1473–1481, 1993.

CHAUHAN, V.S. et al. Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. **J Immunol** v.180, p.8241–8249, 2008.

CHAUHAN, V.S. et al. Prophylactic and therapeutic targeting of the neurokinin-1 receptor limits neuroinflammation in a murine model of pneumococcal meningitis. **J Immunol** v.186, p.7255–7263, 2011.

CHIANG, S.S. et al. Is T helper type2 shift schizophrenia specific? Primary results from a comparison of related psychiatric disorders and healthy controls. **Psychiatry Clin Neurosci** v.67, p.228–236, 2013.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 15, n. 4, p. 379–400, 2011.

CONNOLLY, K. R.; THASE, M. E. Emerging drugs for major depressive disorder. **Expert opinion**

**on emerging drugs**, v. 17, n. 1, p. 105–26, 23 mar. 2012.

CORONA, A.W. et al. Fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. **J. Neuroinflammation**, v. 7, p.93, 2010.

CORONA, A. W. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX3CR1)-deficient mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 134–142, 2013.

CUSTÓDIO, C. S. et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **European journal of pharmacology**, v. 713, n. 1-3, p. 31–8, 5 ago. 2013.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, 2008.

DEINHARDT, K.; CHAO, M.V. Shaping neurons: Long and short range effects of mature and proBDNF signalling upon neuronal structure. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 603-609, 2014.

DEUSSING, J. M. Animal models of depression. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 3, n. 4, p. 375–383, 2006.

DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, S.; HOWELL, R.; GOBBI, G. Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: Implications for major depression. **Reviews in the Neurosciences**, v. 23, n. 4, p. 429–443, 2012.

DRAISMA, A.; PICKKERS, P.; BOUW, M.P.; VAN DER HOEVEN, J.G. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. **Crit. Care Med.** v.37, n. 4, p. 1261–1267, 2009.

DREVETS, W. C. Neuroimaging studies of mood disorders. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 813–29, 15 out. 2000.

DUMAN, R. S. et al. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 732–9, 15 out. 2000.

DUMAN, R. S. Pathophysiology of depression: The concept of synaptic plasticity. **European Psychiatry**, v. 17, n. SUPPL. 3, p. 306–310, 2002.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; DE BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 891–909, jan. 2005.

EBNER, K; RUPNIAK, N.M.; SARIA, A. SINGEWALD, N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. **Proc Natl Acad Sci**, v.101, p.4280–4285, 2004.

EBNER, K.; SINGEWALD, N. Stress-induced release of substance P in the locus coeruleus

modulates cortical noradrenaline release. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.376, p. 73-82, 2007.

EBNER, K.; SARTORI, S.B.; SINGEWALD, N. Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress-related disorders. **Curr Pharm Des**, v. 15 , p. 1647-74, 2009.

EISCH, A. J. et al. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 10, p. 994–1005, 15 nov. 2003.

EL YACOUBI, M. et al. Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 6227–32, 13 maio 2003.

EVANSON, N. K.; HERMAN, J. P. Role of Paraventricular Nucleus Glutamate Signaling in Regulation of HPA Axis Stress Responses. **Interdisciplinary information sciences**, v. 21, n. 3, p. 253–260, jan. 2015.

FATOKUN, A. A.; HUNT, N. H.; BALL, H. J. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: Characteristics and potential roles in health and disease. **Amino Acids**, v. 45, n. 6, p. 1319–1329, 2013.

FERREIRA MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1521–1529, 2013.

FIORI, L.M.; TURECKI, G. Gene expression profiling of suicide completers. **Eur. Psychiatry** v.25, p.287–290, 2010a.

FIORI, L.M.; TURECKI, G. Epigenetic regulation of spermidine/spermine N1- acetyltransferase (SAT1) in suicide. **J. Psychiatr. Res.** v.45, p. 1229–1235, 2011.

FIORI, L.M.; MECHAWAR, N.; TURECKI, G. Identification and characterization of spermidine/spermine N1-acetyltransferase promoter variants in suicide completers. **Biol. Psychiatry**, v. 66, p.460–467, 2009.

GARCIA-RECIO, S.; GASCÓN, P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. **BioMed Research International**, v. 2015, n. Table 1, p. 1–14, 2015.

GHOSH, A.; HELLEWELL, J.S. A review of the efficacy and tolerability of agomelatine in the treatment of major depression. **Expert Opin Investig Drugs**, v.16, p. 1999–2004, 2007.

GIAMPIETRI, A. et al. Dual effect of IL-4 on resistance to systemic gram-negative infection and production of TNF- $\alpha$ . **Cytokine**, v. 12, p.417–421, 2000.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nat. Rev. Immunol.** v.5, p. 243—251, 2005.

GLAZIER, A. M.; NADEAU, J. H.; AITMAN, T. J. Finding genes that underlie complex traits. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5602, p. 234 5–9, 20 dez. 2002.

GOBBI, G.; BLIER, P. Effect of neurokinin-1 receptor antagonists on serotonergic, noradrenergic and hippocampal neurons: comparison with antidepressant drugs. **Peptides**, v. 26, p.1383-93, 2005.

GOBBI, G. et al. Neurokinin 1 receptor antagonism requires norepinephrine to increase serotonin function. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.17, p. 328-38, 2007.

GODBOUT, J.P. et al. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 2341–2351, 2008.

GOULD, E. et al. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 715–20, 15 out. 2000.

GRAZIANI, K.; VEDANA, G.; I, A. I. M. Adesão e dificuldades relacionadas ao tratamento medicamentoso em pacientes com depressão. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 67, n. 4, p. 556–562, 2014.

GRIEBEL, G; HOLSBOER, F. Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning?. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 11, p. 462-478, 2012.

GUIPPONI, M. et al. Genetic and epigenetic analysis of SSAT gene dysregulation in suicidal behavior. **Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.** v. 150, p. 799–807, 2009.

GUNDEL ,R. et al. IL-4 induced leucocyte trafficking in cynomolgus monkeys: correlation with expression of adhesion molecules and chemokine generation. **Clin Exp Allergy**, v. 26, p.719–729, 1996.

GUO, Y. et al. Quantitative profiling of neurotransmitter abnormalities in the hippocampus of rats treated with lipopolysaccharide: Focusing on kynurenine pathway and implications for depression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 295, p. 41–46, 2016.

HAROON, E.; RAISON, C. L.; MILLER, A. H. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 137–162, 2012.

HARRISBERGER, F. et al. BDNF Val66Met polymorphism and hippocampal volume in neuropsychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 107–118, 2015.

HASHIMOTO, K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. **Brain Res. Rev.**, 2009, 61(2), 105-123.

HASLER, G. et al. Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1765–

1781, 2004.

HESDORFFER, D. C. et al. Major depression is a risk factor for seizures in older adults. **Annals of neurology**, v. 47, n. 2, p. 246–9, fev. 2000.

HOLMES, A. et al. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 11, p. 580–588, 2003.

HOLMES, A. et al. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1335–1346, jan. 2005.

ISUNG, J. et al. Low vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in cerebrospinal fluid of suicide attempters. **Transl. Psychiatry**, v. 2, p. 196, 2012a.

JANELIDZE, S. et al. Cytokine levels in the blood may distinguish suicide attempters from depressed patients. **BrainBehav.Immun.** v.25, p. 335–339, 2011.

JIANG, H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. **Brain Behav Immun.** v.48, p. 186–194, 2015.

JURÁNEK, I.; LEMBECK, F. Afferent C-fibres release substance P and glutamate. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 661–4, jun. 1997.

KLEMPAN, T. A et al. Profiling Brain Expression of the Spermidine/Spermine N 1 - Acetyltransferase 1(SAT1) Gene in Suicide. **American journal of medical genetics**, v.150b p.934-43, 5 out. 2009.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of Neural Science**. 4th. ed. [s.l.] McGraw-Hill, 2000.

KELLER, M. et al. Lack of efficacy of the substance p (neurokinin1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 216–23, 1 fev. 2006.

KIM, Y.K.; NA, K.S.; SHIN, K.H.; JUNG, H.Y.; CHOI, S.H.; KIM, J.B. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. **Progress in Neuro- Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.31, p. 1044–53, 2007.

KLOET, E. R. DE; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain : from adaptation to disease. v. 6, n. June, p. 463–475, 2005.

KOO, J.W.; DUMAN, R.S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proc Nat Acad Sci**, v. 105, p.751–6, 2008.

KRAMER, M. S. et al. Demonstration of the Efficacy and Safety of a Novel Substance P (NK1) Receptor Antagonist in Major Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 385–392, 2004.

KRISHNAN, R. et al. Effects of etanercept therapy on fatigue and symptoms of depression in subjects treated for moderate to severe plaque psoriasis for up to 96 weeks. **The British journal of**

**dermatology**, v. 157, n. 6, p. 1275–7, dez. 2007.

KRYSTAL JH. N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonists and the promise of rapid-acting antidepressants. **Arch Gen Psychiatry**, v. 67, p. 1110–11, 2010.

KUBERA, M. et al. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 744–759, 2011.

KUBERA, M. et al. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4months. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 96–104, 2013a.

KUBERA, M. et al. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4months. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 96–104, 2013b.

KUPFER, D.; FRANK, E.; PHILLIPS, M.L. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. **Lancet**, v. 379, p. 1045–55, 2012.

LAI, J.P. et al. Detection of substance P and its receptor in human fetal microglia. **Neurosci.** v.101, p. 1137–1144, 2000.

LANG, U. E.; BORGWARDT, S. Molecular mechanisms of depression: Perspectives on new treatment strategies. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 761–777, 2013.

LAPCHAK, P.A.; ARAUJO, D.M.; HEFTI, F. Systemic interleukin-1 beta decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. **Neuroscience**, v.53, n.2, p.297-301, 1993.

LELAS, S. et al. NK1 receptor antagonism lowers occupancy requirement for antidepressant-like effects of SSRIs in the Gerbil forced swim test. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 232–240, 2013.

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 2, p. 764–785, 2012.

LINDROTH, P.; MOPPER, V. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde, **Anal. Chem.** v.51, p. 1667–74, 1979.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic Neurotransmission : The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. p. 1563–1586, 2009.

LOTZ, M.; VAUGHAM, J.H.; CARSON, D.A.; Effects of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. **Science**, v.24, p.1218–21, 1998.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337–341, 2015.

LU, B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. **Neuron**, v.39, n.5, p. 735-738, 2003.

LUGO-HUITRÓN, R. et al. Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

MACKAY, G. M. et al. Kynurenine metabolites and inflammation markers in depressed patients treated with fluoxetine or counselling. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, p.425–435, 2009.

MAES, M.; SMITH, R.; SCHARPE, S. The monocyte/T-lymphocyte hypothesis of major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, p.111–6, 1995.

MAES, M. Psychological stress and the inflammatory response system. **Clin. Sci. (Lond.)**, v.101, pp. 193–194, 2001.

MAES, M. et al. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: Further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. **Journal of Affective Disorders**, v. 141, n. 1, p. 55–62, 2012.

MAES, M. et al. In depression, bacterial translocation may drive inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress (O&NS), and autoimmune responses directed against O&NS-damaged neopeptides. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 127, n. 5, p. 344–354, 2013.

MAJD, M. et al. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial of Celecoxib Augmentation of Sertraline in Treatment of Drug-naive Depressed Women: A Pilot Study. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 14, n. 3, p. 891–9, jan. 2015.

MAMDANI, F. et al. Variable telomere length across post-mortem human brain regions and specific reduction in the hippocampus of major depressive disorder. **Translational psychiatry**, v. 5, p. e636, jan. 2015.

MAO, Q.-Q. et al. Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: Effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1211–1216, 1 out. 2009.

MARKS, D. M.; PAE, C.-U.; PATKAR, A. A. Triple reuptake inhibitors: the next generation of antidepressants. **Current neuropharmacology**, v. 6, n. 4, p. 338–343, 2008.

MCEWEN, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 721–31, 15 out. 2000.

- MENDLEWICZ, J. et al. Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. **International clinical psychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 227–31, jul. 2006.
- MILLAN M.J. et al. Selective blockade of neurokinin (NK1) receptors facilitates the activity of adrenergic pathways projecting to frontal cortex and dorsal hippocampus in rats. **J Neurochem**, v. 76, p.1949-54, 2001.
- MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732–41, 1 maio 2009.
- MIRE-SLUIJS A.R. Interleukin-4 Cytokines. **New York, Academic Press**, p 53–68, 1998.
- MONTEGGIA, L.M. et. al. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.29, p.10827-10832, 2004
- MONTEGGIA, L.M. et. al. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. **Biol. Psychiatry**, v. 61, n.2, p. 187- 197, 2007.
- MORMÈDE, C. et al. Conditioned taste aversion with lipopolysaccharide and peptidoglycan does not activate cytokine gene expression in the spleen and hypothalamus of mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 18, n. 2, p. 186–200, mar. 2004.
- MYINT, A.M. et al. Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. **J. Affect. Disord.** v.98, p. 143—151, 2007
- MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy. **Current medicinal chemistry**, v.18, p. 1820-1831, 2011.
- NAKAMURA, T.; SHINNO, H.I.; CHIHARA, A. Insulin and glucagon as a new regulator system for tryptophan oxygenase activity demonstrated in primary cultured rat hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 255, p.7533–7535, 1980.
- NELMS, K.; KEEGAN, A.D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J.J.; PAUL, WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 701–738, 1999.
- NESTLER, E. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, p. 13-25, 2002.
- NESTLER, E.; HYMAN, S. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, 2010.
- NOUWEN, A.; LLOYD, C. E.; POUWER, F. Depression and type 2 diabetes over the lifespan: a meta-analysis. Response to Mezuk et al. **Diabetes care**, v. 32, n. 5, p. e56; author reply e57, maio 2009.
- NUTT, D. J. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment.

**The Journal of clinical psychiatry**, v. 67 Suppl 6, p. 3–8, jan. 2006.

O'CONNOR, J.C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Mol. Psychiatry**, v.14, p. 511–522, 2009.

OGBONNAYA E.S. et al. Adult hippocampal neurogenesis is regulated by the microbiome. **Biol Psychiatry**, v. 78, p.7–9 2015.

OLIVEIRA, M. A. DE. O suicídio no estado do Ceará: estudo de epidemiologia ecológica. p. 1–111, 2010.

PADMOS, R.C. et al. Genetic and environmental influences on pro-inflammatory monocytes in bipolar disorder: a twin study. **Arch Gen Psychiatry**, v.66, p.957-65, 2009.

PARK, S.E. et al. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. **J. Neuroinflammation**, v. 8, p. 12, 2011.

PENNINX, B. W. et al. Chronically depressed mood and cancer risk in older persons. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 24, p. 1888–93, 16 dez. 1998.

PETRONIS, A. et al. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? **Schizophrenia bulletin**, v. 29, n. 1, p. 169–78, jan. 2003.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A; JALFRE, M. “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **European journal of pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 291–294, 1978.

POUSSET, F.; CREMONA, S.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W.; PARNET, P. Interleukin-4 and interleukin-10 regulate IL-1 induced mouse primary astrocyte activation: a comparative study. **Glia**, v. 26, p.12–21, 1999.

PRESITS, P.; MOLNÁR-PERL, I. HPLC of tryptophan and its metabolites using simultaneously UV, native fluorescence and pre-column fluorescence derivatization. **Chromatographia**. v. 57; Suppl.; p. 87-92; 2003.

PROJETO SÃO PAULO MEGACITY [Internet]. Disponível em: <http://www.hcnet.usp.br/ipq/projetos/index.php>. (Acessado em 17 de abril de 2015)

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3–33, 2003.

RAETZ, C. R. H.; CHRIS WHITFIELD. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annu Rev Biochem.**, n. 71, p. 1–57, 2002.

RACAGNI, G.; POPOLI, M. The pharmacological properties of antidepressants. **Int Clin Psychopharmacol**, v.25, p. 117-131, 2010.

- RAISON, C.L. et al. CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN- $\alpha$ : relationship to CNS immune responses and depression. **Mol. Psychiatry**, v.15, p. 393—403, 2010.
- RASLEY, A. et al. Expression of functional NK-1 receptors in murine microglia. **Glia**, v. 37, p. 258–267, 2002.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 3, p. 659–661, 2008.
- REIACH, J. S. et al. Reduced adenylyl cyclase immunolabeling and activity in postmortem temporal cortex of depressed suicide victims. **Journal of affective disorders**, v. 56, n. 2-3, p. 141–51, dez. 1999.
- ROCHE, M. et al. Neurokinin-1 receptor deletion modulates behavioural and neurochemical alterations in an animal model of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 91–98, 2012.
- RUSH, A. J. et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: A STAR\*D report. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 11, p. 1905–1917, 2006.
- RUSSO, S.; NESTLER, E. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. September, p. 609–625, 2013.
- SAARELAINEN, T. et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **J. Neurosci.**, v.23, n.1, p. 349–357, 2003.
- SANTAMARIA, A. et al. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. **Neuroreport** v.12, p.2693–2696, 2001.
- SANTARELLI, L. et al. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1912–1917, 2001.
- SANTOS, J. et al. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. **Gut** v.48, p.630–636, 2001.
- SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders. A review of supporting evidence. **International journal of psychiatry**, v. 4, n. 3, p. 203–17, set. 1967.
- SEIDEL, A. et al. Major depressive disorder is associated with elevated monocyte counts. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.94, p.198–204, 1996.
- SELIGMAN, M. E.; ROSELLINI, R. A.; KOZAK, M. J. Learned helplessness in the rat: time course,

immunization, and reversibility. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 88, n. 2, p. 542–7, fev. 1975.

SEQUEIRA, A. et al. Implication of SSAT by gene expression and genetic variation in suicide and major depression. **Arch. Gen. Psychiatry**. v. 63, p. 35–48, 2006.

SEQUEIRA, A. et al. Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. **Mol. Psychiatry**. v. 12, p.640–655, 2007.

SHIMIZU, E. et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70–5, 1 jul. 2003.

SODERHOLM, J. D. ; PERDUE, M. H. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol**. v. 280, p.7–13, 2001.

SONG, C.; LEONARD, B. E. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 627–647, jan. 2005.

SONG, C.; WANG, H. Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 760–768, 2011.

SOUSA, C. N. S. **Efeitos comportamentais e neuroquímicos de ácido alfa-lipóico e desvenlafaxina em modelo animal de depressão induzido por corticosterona**. 2014. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

STAHL, S. M.; MUNTNER, N.; GRADY, M. M. **StahFs Essential Psychopharmacology Neuroscientific Basis and**. Thrid ed. San Digeo: Cambridge University Press, 2008.

STEINER, J. et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. **J Psychiatr Res**. v. 42, p.151-7, 2008.

STEINHOFF, M. S. et al. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. **Physiological reviews**, v. 94, n. 1, p. 265–301, 2014.

STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777–90, 30 jun. 2010.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 6, p. 1211–1227, 2013.

SUBLETTE, M.E. et al. Plasma kynurenine levels are elevated in suicide attempters with major depressive disorder. **Brain Behav Immun**. v.25, p.1272-8, 2011.

- THASE, M. E.; DENKO, T. Pharmacotherapy of mood disorders. **Annual review of clinical psychology**, v. 4, p. 53–91, 2008.
- TOKITA, K.; YAMAJI, T.; HASHIMOTO, K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 688–704, 2012.
- URANI, A.; CHOURBAJI, S.; GASS, P. Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 805–28, jan. 2005.
- VON WOLFF, A. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants in the acute treatment of chronic depression and dysthymia: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 144, n. 1-2, p. 7–15, 2013.
- WERNER J. SCHMIDT; MAARTEN E. A. REITH. **Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders**. First Edit ed. Totowa, New Jersey: Human Press, 2005.
- WIDNER, B. et al. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. **Clin Chem** v.43, p. 2424-6, 1997.
- WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, jan. 2005.
- WORLD FEDERATION FOR MENTAL HEALTH. Depression: A Global Crisis. **Who**, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates. **WHO**, 2015.
- YAN, T. C.; HUNT, S. P.; STANFORD, S. C. Behavioural and neurochemical abnormalities in mice lacking functional tachykinin-1 (NK1) receptors: A model of attention deficit hyperactivity disorder. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7-8, p. 627–635, 2009.
- YOUNG, J. J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of affective disorders**, v. 169C, p. 15–20, 2014.
- ZHANG, X. et al. Positive feedback loop of autocrine BDNF from microglia causes prolonged microglia activation. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 715–23, jan. 2014.
- ZHANG, J.C. et al. Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 18, n.4, 2015.
- ZHENG, X. et al. Quantitative analysis of neurochemical panel in rat brain and plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.** v.84, p. 10044–10051, 2012.
- ZORRILLA, E.P. et al. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a

meta-analytic review. **Brain Behav. Immun**, v. 15, p. 199–226, 2001.

**APÊNDICE A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**



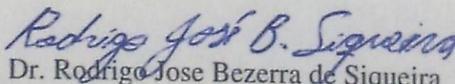
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 137/2014, sobre o projeto intitulado: **“DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS APÓS TRATAMENTO DE ANTAGONISTA DE NK1 NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS”**, de responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macedo Gaspar e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 12 de dezembro de 2014.

Fortaleza, 16 de dezembro de 2014

  
Prof. Dr. Rodrigo José Bezerra de Siqueira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA