



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**BRUNA STEFÂNIA FERREIRA MELLO**

**EXPOSIÇÃO SISTÊMICA DE CAMUNDONGOS ADULTOS A  
LIPOPOLISSACARÍDEO DE *Escherichia coli*: INFLUÊNCIA DO SEXO NAS  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS E EFEITO DO  
TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E DOXICICLINA**

**FORTALEZA**

**2017**

**BRUNA STEFÂNIA FERREIRA MELLO**

**EXPOSIÇÃO SISTÊMICA DE CAMUNDONGOS ADULTOS A  
LIPOPOLISSACARÍDEO DE *Escherichia coli*: INFLUÊNCIA DO SEXO NAS  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS E EFEITO DO  
TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E DOXICICLINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. 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)

---

- M476e Mello, Bruna Stefânia Ferreira.  
EXPOSIÇÃO SISTÊMICA DE CAMUNDONGOS ADULTOS A LIPOPOLISSACARÍDEO DE *Escherichia coli*: INFLUÊNCIA DO SEXO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS E EFEITO DO TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E DOXICICLINA / Bruna Stefânia Ferreira Mello. – 2017.  
178 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.
1. Depressão. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Neuroinflamação. 4. Doxíciclina. 5. Neuroproteção. I. Título.

---

CDD 616.9

**BRUNA STEFÂNIA FERREIRA MELLO**

**EXPOSIÇÃO SISTÊMICA DE CAMUNDONGOS ADULTOS A  
LIPOPOLISSACARÍDEO DE *Escherichia coli*: INFLUÊNCIA DO SEXO NAS  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS E EFEITO DO  
TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E DOXICICLINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 26/10/2017.

BANCA EXAMINADORA:

---

Profª. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Larissa Deadame de Figueiredo Nicolete  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

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

---

Profª. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho a Deus.

Ao meu pai, José Valdízio, eterna fonte de  
inspiração para a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pai de bondade, Senhor do impossível, fonte de toda a minha força, saúde, coragem e fé.

À Universidade Federal do Ceará – UFC e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica - PPGMM, representado pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica dos alunos, propiciando a realização desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro que viabilizou a execução desse projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar, por ter me aceitado e acreditado em mim, bem como por toda a sua orientação, dedicação e pelos ensinamentos fundamentais que contribuíram de forma essencial para meu amadurecimento científico.

A todos que fazem parte do Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM/UFC pela colaboração na execução desse projeto.

À Charlyany Sabino Custódio e ao nosso aluno de iniciação científica, Adriano José Maia Chaves Filho, por todo o empenho e contribuições para a realização desse trabalho.

À Banca Qualificadora, Dr. Thyago Moreira de Queiroz e Dra. Camila Nayane de Carvalho Lima, pelas relevantes contribuições.

À Banca Examinadora, por aceitar cordialmente o convite.

Aos meus pais, José Valdízio de Oliveira Mello e Belaniza Ferreira Mello, por toda educação, orientação, apoio, encorajamento, cuidado e amor. Vocês são meus exemplos a serem seguidos.

Ao meu noivo Marcelo Sá por toda sua compreensão e apoio.

A meu irmão, José Valdízio de Oliveira Mello Filho, pelo convívio diário, carinho,

apoio, cuidado, amizade, pelo seu companheirismo.

À minha avó, Eloiza Ferreira Moura, por todo o seu exemplo de amor, força, orações e carinho, que sempre me incentivou a continuar seguindo em frente na constante busca pelo conhecimento.

Aos meus amigos de todas as épocas, aos meus colegas de doutorado e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse meu sonho.

A todos aqueles, que, mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para as minhas realizações pessoais e profissionais, o meu mais sincero agradecimento.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho.  
Sem metas, os sonhos não têm  
alicerces. Sem prioridades, os sonhos  
não se tornam reais.” Augusto Cury.

## RESUMO

A depressão é um dos mais prevalentes transtornos psiquiátricos, tendo como principais sintomas clínicos a anorexia, a redução da atividade locomotora, a anedonia e a falta de concentração. Há evidências de que alterações imunoinflamatórias estão subjacentes à depressão. Além disso, o sexo é um fator relevante para a manifestação de sintomas da depressão, embora evidências mais recentes apontem para uma gravidade semelhante da depressão em ambos os sexos. O tratamento da depressão é pouco eficaz devido ao fato das medicações existentes não atuarem nos diversos mecanismos fisiopatológicos deste transtorno. Nesse contexto, a combinação de antidepressivos com diferentes mecanismos de ação é uma prática comum em não-respondedores ou respondedores parciais aos antidepressivos. Vale destacar que fármacos antidepressivos e antimicrobianos têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias. Os objetivos do presente estudo foram: i) investigar a influência do sexo nas alterações comportamentais e neuroinflamatórias/oxidativas no modelo animal de sintomas tipo depressão induzido por exposição única ao desafio imune por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* e ii) avaliar em animais machos submetidos à exposição repetida ao LPS, os efeitos terapêuticos da doxiciclina e escitalopram sozinhos e em associação. Para atingir os objetivos propostos o presente estudo se dividiu em dois protocolos. No primeiro protocolo, o modelo de depressão foi induzido pela exposição sistêmica e única de camundongos *Swiss* machos e fêmeas ao lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS – 0,5 mg/kg) e avaliação após 24 horas. No segundo protocolo, apenas animais machos foram submetidos à exposição repetida de LPS por 10 dias sendo que após 5 dias de exposição ao LPS os animais receberam doxiciclina ou escitalopram sozinhos ou em associação. Foram avaliadas alterações inflamatórias/oxidativas, bem como em vias de sinalização protetoras. O protocolo 1 mostrou que apenas animais machos apresentaram alterações comportamentais tipo-depressivo, como aumento de imobilidade do nado forçado e diminuição na preferência por sacarose. As fêmeas apresentaram comportamento ansiogênico no labirinto em cruz elevado. Tanto machos quanto fêmeas apresentaram alterações neuroinflamatórias e oxidativas. No protocolo 2, doxiciclina (DOXI - 10 mg/Kg) ou escitalopram (ESCI - 4 mg/kg) sozinhos ou em associação reverteram o aumento de imobilidade induzido pela exposição repetida ao LPS. Os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  aumentaram após exposição LPS, enquanto DOXI e ESCI reverteram esses níveis. DOXI e o ESCI reverteram o aumento dos níveis de nitrito induzido por LPS. Os níveis de expressão proteica do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e o marcador da molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada-1 (IBA-1) expresso na microglia ativada foram aumentados no grupo exposto ao LPS sendo revertidos pela DOXI e ESCI, enquanto que os níveis de glicogênio sintase quinase-3 (GSK3 $\beta$ ) fosforilada e a proteína quinase regulada extracelular (ERK 1/2) fosforilada foram diminuídos no grupo do LPS e revertidos após o protocolo de tratamento. A DOXI também aumentou os níveis proteicos da ERK 1/2 total e do fator transcricional da proteína de ligação ao elemento de resposta de AMPc (CREB). Com base nos resultados do presente estudo, a DOXI quando administrada sozinha ativou mais mecanismos neuroprotetores em comparação ao ESCI, como aumento dos níveis cerebrais de GSH e CREB fosforilado, além da combinação das duas drogas ter reduzido os níveis de NF- $\kappa$ B e aumentado GSK3 $\beta$  fosforilado. Portanto, sugere-se que a DOXI pode atuar como um antidepressivo, apresentando efeitos superiores aos observados com o escitalopram.

**Palavras-chave:** Depressão; Lipopolissacarídeo; Doxiciclina; Escitalopram; Neuroinflamação, Neuroproteção.

## ABSTRACT

Depression is one of the most prevalent psychiatric disorders, having the main clinical symptoms anorexia, reduced locomotor activity, anhedonia and lack of concentration. There is evidence that immunoinflammatory changes underlie depression. In addition, sex is a relevant factor for the manifestation of depression symptoms, although more recent evidence points to a similar severity of depression in both sexes. The treatment of depression is ineffective due to the fact that existing medications do not act on the different pathophysiological mechanisms of this disorder. In this context, the combination of antidepressants with different mechanisms of action is a common practice in non-responders or partial responders to antidepressants. It is worth mentioning that antidepressant and antimicrobial drugs have shown anti-inflammatory properties. The objectives of the present study were: i) to investigate the influence of sex on behavioral and neuroinflammatory/oxidative changes in the animal model of depression-induced symptoms induced by single exposure to the lipopolysaccharide immune challenge (LPS) of *Escherichia coli*; and ii) to evaluate male animals under repeated exposure to LPS, the therapeutic effects of doxycycline and escitalopram alone and in combination. To reach the proposed objectives, the present study was divided into two protocols. In the first protocol, the depression model was induced by systemic and single exposure of male and female Swiss mice to *E. coli* lipopolysaccharide (LPS - 0.5 mg/kg) and evaluation after 24 hours. In the second protocol, only male animals were submitted to repeated exposure of LPS for 10 days and after 5 days of exposure to LPS the animals received doxycycline or escitalopram alone or in combination. Inflammatory/oxidative alterations were evaluated, as well as in protective signaling pathways. Protocol 1 showed that only male animals presented behavioral-type depressive changes, such as increased immobility of forced swimming and decrease in the preference for sucrose. The females presented anxiogenic behavior in the high cross labyrinth. Both males and females presented neuroinflammatory and oxidative alterations. In protocol 2, doxycycline (DOXI - 10 mg/kg) or escitalopram (ESCI - 4 mg/kg) alone or in combination reversed the increase in immobility induced by repeated exposure to LPS. Levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  increased after LPS exposure, while DOXI and ESCI reversed these levels. DOXI and ESCI reversed the increase in nitrate levels induced by LPS. Protein expression levels of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and the marker of the ionized calcium binding adapter molecule-1 (IBA-1) expressed in the activated microglia were increased in the group exposed to LPS being reverted by DOXI and ESCI, whereas phosphorylated glycogen synthase kinase-3 (GSK3 $\beta$ ) and phosphorylated extracellular regulated kinase (ERK 1/2) levels were decreased in the LPS group and reversed after the treatment protocol. DOXI also increased the protein levels of total ERK 1/2 and the transcriptional factor of the binding protein to the cAMP response element (CREB). Based on the results of the present study, DOXI when administered alone activated more neuroprotective mechanisms compared to ESCI, such as increased brain levels of GSH and phosphorylated CREB, in addition to the combination of the two drugs having reduced levels of NF- $\kappa$ B and increased GSK3 $\beta$  phosphorylated. Therefore, it is suggested that DOXI may act as an antidepressant, presenting higher effects than those observed with escitalopram.

**Keywords:** Depression. Lipopolysaccharide. Doxycycline. Escitalopram. Neuroinflammation. Neuroprotection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação entre as Monoaminas e seus Correlatos Clínicos.....	22
Figura 2 - Teorias Inflamatórias da Depressão.....	26
Figura 3 - Fisiopatologia da Depressão desencadeada pela inflamação.....	28
Figura 4 - Estrutura Química do LPS.....	31
Figura 5 - Mecanismos Inflamatórios do LPS.....	33
Figura 6 - Após o estímulo extracelular por LPS ou citocinas pró-inflamatórias ocorre a formação de ROS e RNS.....	38
Figura 7 - Mecanismos das vias intracelulares no processo inflamatório.....	44
Figura 8 - Estrutura Química do Escitalopram.....	50
Figura 9 - Estrutura Química da Doxíciclina.....	53
Figura 10 - Demonstração esquemática para o protocolo de administração única de LPS.....	60
Figura 11 - Modelo Experimental do Protocolo de Tratamento.....	61
Figura 12 - Tempo de Imobilidade no Teste Nado Forçado em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	71
Figura 13 - Teste de Preferência de Sacarose em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	72
Figura 14 - Teste no Campo Aberto sobre atividade locomotora de animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	74
Figura 15 - Teste no <i>Plus Maze</i> sobre o comportamento de ansiedade em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	76
Figura 16 - Níveis de MDA em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	78
Figura 17 - Níveis de GSH em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	80

Figura 18 - Atividade inflamatória na Mieloperoxidase (MPO) de animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	82
Figura 19 - Níveis de IL-1 $\beta$ em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	84
Figura 20 - Níveis de BDNF em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS.....	85
Figura 21 - Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	86
Figura 22 - Atividade locomotora no campo aberto em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	88
Figura 23 - Mapa do trajeto percorrido pelos animais no teste do campo aberto...	89
Figura 24 - Tempo de Latência no teste da alimentação suprimida pela novidade em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	90
Figura 25 - Níveis de MDA em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	92
Figura 26 - Níveis de GSH em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	93
Figura 27 - Níveis de nitrito em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	95
Figura 28 - Níveis de IBA-1 no hipocampo em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	96
Figura 29 - Níveis hipocâmpais de NF- $\kappa$ B em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	97
Figura 30 - Níveis hipocâmpais de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ em animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	99
Figura 31 - Níveis de ERK1/2 fosforilada e total no hipocampo de animais machos tratados com DOXY e ESCI após administração repetida de LPS.....	101

Figura 32 - Níveis de GSK-3 $\beta$ fosforilado e total no hipocampo de animais machos tratados com DOXY ou ESCI após administração repetida de LPS.....	102
Figura 33 - Níveis de CREB fosforilada no hipocampo de animais machos tratados com DOXY e ESCI após administração repetida de LPS.....	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos Resultados obtidos no Protocolo 1.....	104
Tabela 2 - Resumo dos Resultados obtidos no Protocolo 2.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina

ACh – Acetilcolina

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

AKT – Proteína quinase serina/treonina

AMPC – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ANOVA – Análise de variância

AP-1 – Proteína ativadora 1

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CE – Corpo Estriado

COMT – Catecol-O-metiltransferase

COX-2 – Ciclooxigenase-2

CPF – Córtex Pré-frontal

CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta de AMPC

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

DA – Dopamina

DOXI – Doxiciclina

DSM-V – V Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais

ERK – Proteína quinase regulada extracelular

ESCI – Escitalopram

*et al* – E colaboradores

GSH – Glutathiona reduzida

GSK-3 $\beta$  – Glicogênio sintase quinase-3 $\beta$

h – Hora

HClO – Ácido hipocloroso

HNO<sub>2</sub> – Ácido nitroso

HP – Hipocampo

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal

HT – Hipotálamo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Pêroxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

IBA1 – Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada-1

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenase

i.p. – Intraperitoneal

IFN-γ – Interferon gama

IκB – Proteína inibitória de kappa B

IKK – IκB quinase

IL – Interleucina

IL-1β – Interleucina 1β

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IO&NS – Inflamatória por vias de estresse oxidativo e nitrosativo

I&ND – Inflamatória & neurodegenerativa

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

ISRS – Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina

KCl – Cloreto de potássio

Kg – Quilograma

LBP – Proteína ligadora de LPS

LPS – Lipopolissacarídeo

MAO – Monoamina oxidase

MDA – Malondialdeído

MAPK – Proteína quinase ativada por mitogênio

mg - Miligrama

MPO – Mieloperoxidase

MPP – Matriz metaloproteinase

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina

MyD88 – Fator de diferenciação mielóide 88

NA – Noradrenalina

(NaNO<sub>2</sub>) – Nitrito de sódio

NE – Norepinefrina

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

NO – Óxido Nítrico

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato

NS – Não Significativo

N<sub>2</sub>O – Óxido nitroso

O<sub>2</sub> – Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup> – Superóxido

OH<sup>-</sup> – Hidroxila OH-

ONOO<sup>-</sup> – Peroxinitrito

O&NS – Vias de estresse oxidativo e nitrosativo

PBS – Tampão fosfato salino

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – Proteína quinase A

RNA<sup>t</sup> – RNA transportador

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

RO<sup>-</sup> – Alcoxila

ROO<sup>-</sup> – Peroxila

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

SRI – Sistema de Resposta Inflamatória

TAK1 – Fator de crescimento transformador  $\beta$ -ativado quinase 1

TBARS – Substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico

Th1 – T *helper* do tipo 1

Th2 – T *helper* do tipo 2

TLRs – Receptores *Toll-like*

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1	Fisiopatologia da Depressão.....	21
2.2	Hipótese Inflamatória da Depressão .....	24
2.3	O papel do LPS na Depressão.....	30
2.4	O Envolvimento do Estresse Oxidativo na Depressão.....	35
2.5	Participação de Mecanismos protetores/inflamatórios pelas vias NF- kB, ERK, GSK, IBA-1, CREB.....	39
2.6	Diferenças de Gênero da Depressão.....	45
2.7	Tratamento Farmacológico da Depressão.....	47
2.7.1	<i>Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS).....</i>	<i>49</i>
2.7.2	<i>Doxiciclina e seu Papel Neuroprotetor.....</i>	<i>52</i>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
4.1	Objetivos Gerais.....	57
4.2	Objetivos Específicos.....	57
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
5.1	Animais.....	59
5.2	Drogas.....	59
5.3	Procedimento Experimental.....	60
5.4	Testes Comportamentais.....	62
5.4.1	<i>Teste do Nado Forçado.....</i>	<i>62</i>
5.4.2	<i>Teste do Campo Aberto.....</i>	<i>62</i>
5.4.3	<i>Labirinto em Cruz Elevado (Pluz maze).....</i>	<i>63</i>
5.4.4	<i>Preferência por Sacarose.....</i>	<i>63</i>

5.4.5	<i>Teste da Alimentação Suprimida pela Novidade</i> .....	64
5.5	Testes Neuroquímicos.....	64
5.5.1	<i>Determinação das Alterações Oxidativas</i> .....	65
5.5.1.1	<i>Determinação dos níveis de TBARS</i> .....	65
5.5.1.2	<i>Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)</i> .....	65
5.5.1.3	<i>Determinação do conteúdo de Nitrito</i> .....	66
5.6	Determinação de parâmetros relacionados a sinalizações pró-inflamatórias e protetoras.....	66
5.6.1	<i>Atividade da Mieloperoxidase (MPO)</i> .....	66
5.6.2	<i>Teste de Elisa para dosagem dos níveis de IL1<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math> e BDNF</i> .....	67
5.7	Expressão proteica de ERK, IBA, GSK, NFkB, p-CREB por <i>Western Blotting</i> .....	68
5.7.1	<i>Preparação do extrato total de proteínas</i> .....	68
5.7.2	<i>Método Bradford para dosagem de proteínas</i> .....	68
5.7.3	<i>Western Blotting</i> .....	69
5.8	Análise estatística dos resultados.....	70
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
6.1	Influência do sexo sobre o tempo de imobilidade no nado forçado em camundongos expostos ao LPS.....	71
6.2	Influência do sexo sobre a preferência por sacarose em camundongos expostos ao LPS.....	72
6.3	Influência do sexo sobre a atividade locomotora no Campo Aberto em camundongos expostos ao LPS.....	73
6.4	Influência do sexo sobre o comportamento de ansiedade no Labirinto em Cruz elevado em camundongos expostos ao LPS.....	75
6.5	Influência do sexo sobre a peroxidação lipídica de áreas cerebrais de camundongos expostos ao LPS.....	77

6.6	Influência do sexo sobre os níveis cerebrais de GSH em camundongos expostos ao LPS.....	79
6.7	Influência do sexo sobre a atividade da mieloperoxidase em áreas cerebrais de camundongos expostos ao LPS.....	81
6.8	Influência do sexo sobre os níveis cerebrais de IL1 $\beta$ em camundongos expostos ao LPS.....	83
6.9	Influência do sexo sobre os níveis hipocampais de BDNF em camundongos expostos ao LPS.....	85
6.10	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre o comportamento tipo-depressivo induzido por administração repetida de LPS.....	86
6.11	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a atividade locomotora.....	87
6.12	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre o teste da alimentação suprimida pela novidade.....	90
6.13	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre o estresse oxidativo induzido por LPS.....	91
6.14	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre as alterações nos níveis de nitrito induzidas por LPS.....	94
6.15	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão de proteína IBA-1 em animais expostos ao LPS.....	96
6.16	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em animais expostos a LPS.....	97
6.17	Tratamento com doxiciclina ou escitalopram reverte as alterações nos níveis de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ induzidas por LPS.....	98
6.18	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão da proteína ERK 1/2 fosforilada em animais expostos ao LPS.....	100

6.19	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão da proteína GSK-3 $\beta$ fosforilada em animais expostos ao LPS.....	102
6.20	Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão de CREB fosforilado em animais expostos ao LPS.....	103
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>122</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>178</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno mental crônico, comum e recorrente, tendo uma estimativa de 350 milhões de pessoas afetadas mundialmente. É a principal causa de incapacidade em todas as faixas etárias, desde os jovens até os idosos, prevalecendo mais em mulheres que em homens. Esse transtorno psiquiátrico pode acarretar ao suicídio, no qual cerca de 800 mil pessoas morrem a cada ano, sendo a segunda principal causa de morte entre pessoas com idade entre 15 e 29 anos (OMS, 2016).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), a depressão pode manifestar-se como transtorno depressivo maior. Nesse caso, os critérios do DSM-V especificam que pelo menos cinco dos nove sintomas que se seguem devem estar presentes: humor deprimido, redução do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de desvalia ou culpa inapropriados, redução da concentração e pensamentos de morte ou de suicídio. Para o diagnóstico, é necessário que os sintomas durem pelo menos duas semanas e um deles seja, obrigatoriamente, humor deprimido ou perda de interesse ou prazer (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

Além do papel bem estabelecido das disfunções do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão, foi encontrada uma forte ligação entre depressão e alterações imuno-inflamatórias (MAES, 2001; ZORRILLA, 2001). Existe uma comunicação bidirecional entre o sistema imunológico e o cérebro. Essa comunicação neuroimune é relevante e essencial para montar as respostas imunológicas, fisiológicas e comportamentais adequadas. Ademais, a ativação de respostas imunes inatas no cérebro está implicada na etiopatogenia de vários transtornos psiquiátricos, incluindo depressão, transtorno de estresse pós-traumático, autismo e esquizofrenia. Nesse sentido, o desafio imune é um importante fator predisponente no desenvolvimento desses distúrbios e uma fonte potencial de inflamação no cérebro. A esse respeito, um desafio imune, agudo ou crônico, irá desencadear sinais inflamatórios periféricos e centrais (SENS, 2016).

Nesse contexto, estudos com modelos animais vêm demonstrando que a estimulação do sistema imune, através de administração do lipopolissacarídeo (LPS), de citocinas pró-inflamatórias ou de indução de uma infecção bacteriana pode resultar na neuroinflamação (O'CONNOR *et al.*, 2003; JOHNSON *et al.*, 2004; JI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; BIESMANS *et al.*, 2015) e no desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo, evidenciado pelo desespero comportamental (O'CONNOR *et al.*, 2003; JI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2015) ou anedonia (KASTER *et al.*, 2012; JI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014). Assim, em uma inflamação periférica, induzida pelo LPS, causaria sintomas depressivos em humanos e comportamento tipo-depressivo em roedores (REICHENBERG *et al.*, 2001; RAETZ & WHITFIELD, 2002; DANTZER *et al.*, 2008).

Há um crescente número de evidências sobre as diferenças de comportamento entre mulheres e homens, sendo as mulheres mais suscetíveis ao desenvolvimento de distúrbios psicossociais relacionados ao estresse, incluindo depressão (HANKIN *et al.*, 1998), ansiedade (LEWINSOHN *et al.*, 1998) e transtorno de estresse pós-traumático (BRESLAU, 2002). Estudos revelam que a depressão clínica é acompanhada pela ativação de vias/mecanismos imuno-inflamatórios, oxidativos e nitrosativos (MAES *et al.*, 1995; MAES, 2011; KUBERA *et al.*, 2011b; LEONARD & MAES, 2012).

Destarte, a terapia clínica utilizada no tratamento da depressão é realizada com os antidepressivos clássicos, tais como os inibidores da monoamina oxidase, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina e da norepinefrina e os tricíclicos (MAES *et al.*, 1997; UHER *et al.*, 2014). Porém, estudos em animais revelaram que o uso de antimicrobianos, como a doxiciclina, minociclina, ceftriaxona possuem efeitos neuroprotetores, semelhantes aos antidepressivos, evidenciando o uso dessas drogas no tratamento de transtornos neurodegenerativos (ROTHSTEIN *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2007; ARAKAWA *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2013).

Com base nas informações supracitadas, o presente trabalho visou determinar a influência do sexo nas alterações induzidas pela administração sistêmica e única de LPS em camundongos adultos, bem como o efeito do tratamento com escitalopram e doxiciclina sozinhos e em associação na reversão de alterações tipo-depressão em animais submetidos a administração repetida de LPS.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fisiopatologia da Depressão

A etiologia da depressão não é completamente conhecida, sendo de característica multifatorial com influências biológicas, psicológicas, ambientais e genéticas. Em relação às possíveis causas biológicas, a primeira hipótese a ser considerada foi a deficiência funcional dos neurotransmissores monoaminérgicos, os quais são serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA). Portanto, considera-se que esses neurotransmissores estão envolvidos na fisiopatologia da depressão (SCHILDKRAUT, 1965; COPPEN, 1972; AGUIAR *et al.*, 2011).

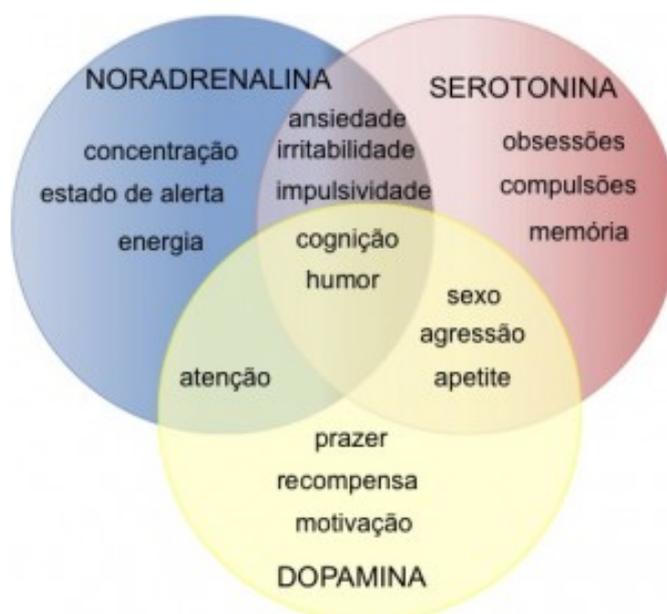
A esse respeito, a serotonina é o neurotransmissor mais extensamente estudado na etiologia da depressão (VAN PRAAG & KORF, 1971). A molécula é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, pela ação da enzima triptofano hidroxilase, a qual converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano. Além disso, o L-aminoácido aromático descarboxilase converte o 5-hidroxitriptofano em serotonina (STRASSER *et al.*, 2016; PALEGO *et al.*, 2016; BRUMMELTE *et al.*, 2017). Porém, o triptofano pode ser degradado pela ação da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), em quinurenina e posteriormente em ácido quinurênico e ácido quinolínico, através da ativação das via das quinureninas (FOWLER *et al.*, 2015). Portanto, a ativação da via da IDO diminui os níveis de triptofano, conseqüentemente uma menor produção do neurotransmissor 5-HT (LEONARD & MAES, 2012). Esse neurotransmissor também sofre uma ação de degradação da enzima monoamina oxidase (MAO). Além disso, o desequilíbrio dos receptores serotoninérgicos, também estariam envolvidos na fisiopatologia da depressão (WILLNER, 1990; DEAKIN *et al.*, 1991; GRAEFF & BRANDÃO, 1999; FOWLER *et al.*, 2015).

Conforme previamente mencionado, a norepinefrina (NE) ou também chamada de noradrenalina (NA), e a dopamina (DA) são neurotransmissores catecolaminérgicos que foram implicados na hipótese das monoaminas (SCHILDRAUT, 1965; BUNNEY & DAVIS, 1965; WILNNER, 1990). Assim, a NE é sintetizada a partir do aminoácido tirosina, o qual é convertido em L-DOPA, através da ação da enzima tirosina hidroxilase. Por conseguinte, a L-DOPA é convertida em

DA, pela ação da enzima DOPA descarboxilase. Por último, DA é convertida em NE, pela ação enzimática da dopamina  $\beta$ -hidroxilase. Porém, a ação das enzimas MAO e Catecol-O-metiltransferase (COMT) irão degradar os neurotransmissores DA e NE, ocorrendo um *déficit* na neurotransmissão e na alteração de seus respectivos receptores (ULMANEN *et al.*, 1997; FINBERG, 2014).

O modelo monoaminérgico é originado em pequenos núcleos no tronco cerebral e mesencéfalo e projetam-se difusamente pelo córtex e sistema límbico. Assim, as áreas límbicas (hipocampo, amígdala, cortex pré-frontal e hipotálamo) e demais áreas do circuito que regulam o humor apresentam uma interação com neurotransmissores 5-HT, NA, DA (NEMEROFF, 1998; ORDWAY *et al.*, 1999; IROTANI *et al.*, 2006). Portanto, os sistemas monoaminérgicos associados a acetilcolina (Ach), exercem efeitos de integração e modulação sobre vários sintomas comportamentais, como as atividades do humor, cognição, psicomotora, memória, prazer, concentração, sono, apetite, atenção (JOCA *et al.*, 2007; DUNLOP & NEMEROFF, 2007). Ansiedade, irritabilidade e impulsividade também são evidenciadas, conforme figura abaixo (SUMEGI, 2008; WOOD & VALENTINO, 2016).

Figura 1 – Interação entre os sistemas monoaminérgicos e seus correlatos clínicos.



Há evidências que o modelo monoaminérgico estaria envolvido com o funcionamento neuroendócrino relacionado ao estresse e que a depressão seria uma resposta a esse estresse crônico (MUSSELMAN *et al.*, 2003; AGUIAR *et al.*, 2011). Nesse sentido, estudos têm sugerido que o sistema monoaminérgico não representa a via final na regulação do humor, mas exerce uma influência modulatória. Assim, outros sistemas que estariam regulando a plasticidade neuronal e sináptica também teriam importância central na neurobiologia e tratamento desses transtornos (SANACORA *et al.*, 2008; SENS, 2017).

Portanto, o estresse é o agente causal mais importante do desenvolvimento do transtorno depressivo maior (KASCKOW *et al.*, 2001). Assim, o estresse ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), pela via neuroendócrina, o qual desempenha um papel fundamental nas respostas ao estresse. Dessa forma, o estresse promove a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), na área hipotalâmica, o qual promove a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior, que por sua vez, induz a secreção de glicocorticóides na glândula adrenal, os quais são mediadores do estresse. Nesse sentido, estudos indicaram que o aumento de CRH no líquido de pacientes deprimidos, evidenciando a hiperatividade do eixo HPA na patogênese de distúrbios depressivos (NEMEROFF *et al.*, 1984; BALE & VALE, 2004; WOOD & WOODS, 2007; HOLSBOER & ISING, 2008).

Por outro lado, a elevação dos glicocorticóides suprime a secreção de CRH, através dos receptores de glicocorticóides, no hipocampo, evidenciando um *feedback* negativo do eixo HPA (OWENS & NEMEROFF, 1991; DE KLOET *et al.*, 1998). Porém, em um quadro depressivo, o estresse eleva os níveis de glicocorticóides, os quais diminuem o volume do hipocampo, que por sua vez, induz o *déficit* do *feedback* negativo do eixo HPA (SAPOLSKY *et al.*, 1985; VIDEBECH & RAVNKILDE, 2004; DE KLOET *et al.*, 2005). Portanto, mudanças volumétricas de hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior e gânglios basais foram detectados em pacientes que sofrem de depressão a longo prazo (CAMPBELL & MACQUEEN, 2006). Redução do volume hipocampal é associada a *déficits* neurocognitivos encontrados em transtornos de humor (BROWN *et al.*, 2004; MAES *et al.*, 2009c). O hipocampo é de particular interesse, uma vez que na depressão é um membro chave do sistema límbico, controlador do comportamento

emocional e na regulação do eixo HPA (DE KLOET *et al.*, 1998; MAES *et al.*, 2009c).

A esse respeito, há evidências que a neuroprogressão, a qual está envolvida com o processo de neurodegeneração, neurogênese reduzida, plasticidade neuronal e apoptose celular, desempenha um papel na fisiopatologia da depressão (BERK *et al.*, 1997; MAES *et al.*, 2009c, 2011d). Nesse contexto, o estresse crônico diminui a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o qual leva a alterações morfológicas dos neurônios no hipocampo (MONTEGGIA *et al.*, 2007). Esse fator neurotrófico está associado ao crescimento, função e aprendizado de células neuronais (DUMAN & MONTEGGIA, 2006; SCHMIDT & DUMAN, 2007; SCHMIDT & DUMAN, 2010), o qual é essencial para sobrevivência e diferenciação fenotípica de células neuronais durante o desenvolvimento e na manutenção e proteção/reparação de neurônios maduros em lesões cerebrais adultas (SAAVEDRA *et al.*, 2008). Portanto, estudos clínicos demonstraram baixos níveis de BDNF no soro de pacientes com transtorno depressivo maior (KAREGE *et al.*, 2002; FUCHIKAMI *et al.*, 2011).

## **2.2 Hipótese Inflamatória da Depressão**

Além de todas as hipóteses elencadas para a fisiopatologia da depressão no item anterior, a depressão também pode ser originada por processos inflamatórios. Nesse sentido, desde a década de 80, foram publicados os primeiros estudos sobre depressão, desencadeada pela inflamação, pela ativação de células monocíticas e células T. Com isso, na prática clínica foram lançadas as bases para uma nova hipótese que a inflamação e a ativação imunitária mediada por células são fatores-chaves para o desenvolvimento da depressão (MAES *et al.*, 1990-1991, 1991b, 1992a, 1992b, 1993, 1993a).

A esse respeito, o papel das citocinas na depressão foi proposto pela primeira vez por Smith (1991), sob a forma da "teoria de macrófagos de depressão" e ainda estudada por Maes no início de 1990 (MAES *et al.*, 2012). Essa teoria foi postulada na observação das concentrações sanguíneas elevadas de marcadores inflamatórios, em pacientes com depressão clínica grave associada a uma resposta

de fase aguda. De acordo com essa teoria, as citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela resposta da fase aguda na inflamação, ocasionando vários aspectos clínicos de depressão, como hiperatividade do eixo HPA e distúrbio no metabolismo da serotonina (MAES, 1994c).

Com base nas evidências de investigação e revisão literária de Smith (1991), concordou-se que os macrófagos são ativados pelos linfócitos T e, portanto, que a depressão é caracterizada pela ativação imune mediada por células (MAES *et al.*, 1995). Com isso, os sintomas psicossomáticos ou vegetativos que ocorrem na depressão são manifestações celulares, mediadas pela ativação imunitária, assemelhando-se aos comportamentos tipo-depressivos em modelos de animais (MAES, 1993; MAES *et al.*, 1993).

Com essas novas evidências, a teoria dos macrófagos modificou-se para “Teoria de ativação do Sistema de Resposta Inflamatória (SRI)”, devido os vários aspectos do sistema inflamatório serem correlacionados com a imunidade celular durante a depressão maior (SONG *et al.*, 1998; VANWEST & MAES, 1999). Assim, a inflamação envolve a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas. Nesse processo, são envolvidas células, como monócitos, neutrófilos, macrófagos e células da cascata do complemento (SCHIEPERS *et al.*, 2005).

A ativação do SRI na depressão está relacionada com a hiperatividade do eixo HPA, sugerindo que a depressão é induzida por citocinas pró-inflamatórias. A hiperatividade do eixo ocorre pela interação imunoendócrina, ou seja, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) também aumentam a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) por ação direta ou mediante aumento do efeito do hormônio corticotrofina (CRH), evidenciando essa hiperatividade (MAES *et al.*, 1993a, 1993d).

Após novos estudos, a teoria foi denominada de “Indução inflamatória por vias de estresse oxidativo e nitrosativo (IO&NS)”, devido as evidências mostrarem que não acontecia somente à ativação do SRI, mas também ocorria ativação da via do estresse oxidativo e nitrosativo (MAES, 2008). Em 2010, a hipótese de depressão foi modificada para teoria da “Resposta inflamatória & neurodegenerativa (I&ND)” (MAES, 2010). Essa teoria reúne os conceitos inflamatórios por vias de estresse oxidativo e nitrosativo acompanhada por neurodegeneração e diminuição da

neurogênese (GARDNER & BOLES, 2010; MAES, 2010; ZUNSZAIN *et al.*, 2013). Assim, a neurogênese reduzida é associada com níveis baixos de neurotrofinas, por exemplo, o fator neutrótico derivado no cérebro (BDNF), o qual regula a plasticidade neuronal e sináptica na depressão (TANCRED *et al.*, 1992; MURRAY & LYNCH, 1998; ANGELUCCI *et al.*, 2005). A figura seguinte (figura 2) sequencia as teorias inflamatórias de acordo com seus períodos de descoberta.

Figura 2 - Teorias Inflamatórias da Depressão.



Fonte: elaborada pela autora.

Baseada em todas as teorias, verificou-se que existe uma comunicação bidirecional entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o sistema imunológico, a qual é necessária para a montagem imunológica apropriada, ou seja, respostas comportamentais e fisiológicas à estimulação imune (KELLEY *et al.*, 2003). Com isso, uma resposta aos estímulos imunes periféricos, decorrentes de uma administração sistêmica de um agente pró-inflamatório, são produzidas e liberadas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, por células gliais (astrócitos e microglia) no cérebro (LAYE *et al.*, 1994), as quais servem como uma fonte e alvo de mediadores pró-inflamatórios. Dessa forma, a resposta dominante para vários tipos de lesões no SNC é a ativação da microglia e astrócitos, muitas vezes referida como gliose, nos locais de dano (KREUTZBERG, 1996; NORENBORG, 2005; O'CALLAGHAN & SRIRAM, 2005).

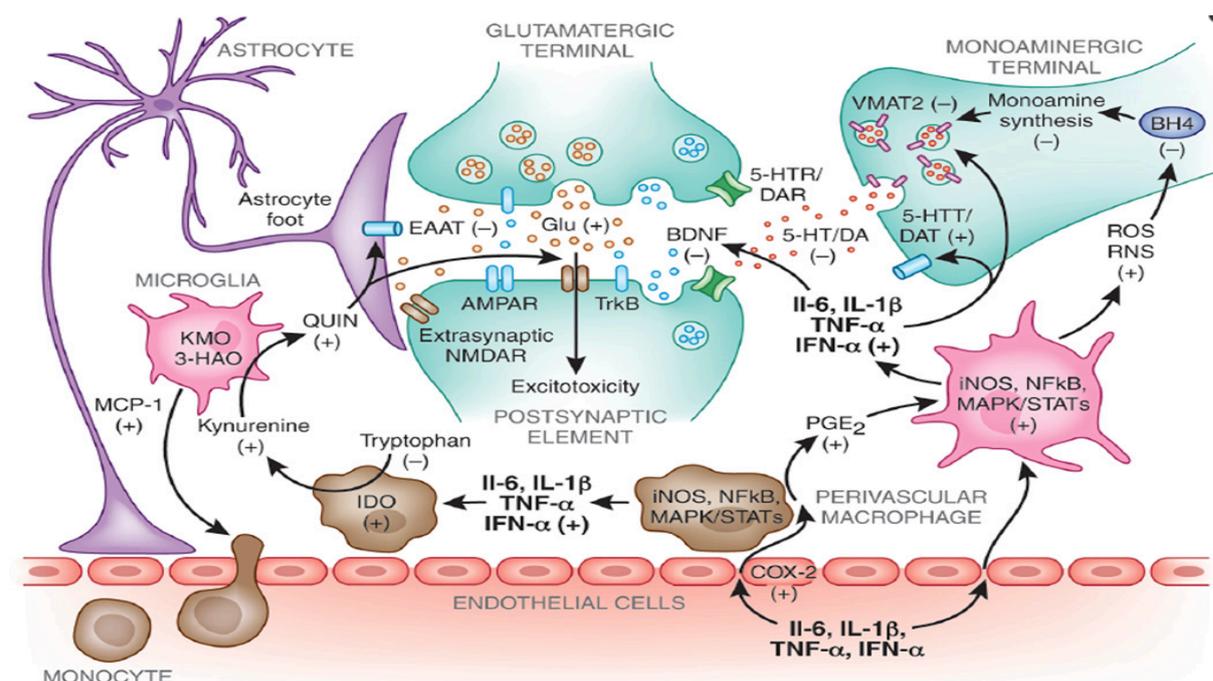
Nesse contexto, no SNC, incluindo as células imunes inatas, microglia e macrófagos, desempenham um papel integrante na recepção e propagação de sinais inflamatórios que são iniciados na periferia. A ativação de células imunes inatas periféricas provoca a secreção de citocinas pro-inflamatórias, incluindo interleucina IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), as quais utilizam as vias neurais (GOEHLER *et al.*, 1998; KONSMAN *et al.*, 2000; DANTZER *et al.*, 2000), humoral (LAFLAMME *et al.*, 1999) e barreira hematoencefálica para enviar os sinais para o SNC (CHING *et al.*, 2007). Esse sinal inflamatório, por sua vez, induz macrófagos do SNC e microglia a produzir as mesmas citocinas (MAES *et al.*, 1990-1991; 1993d, 1994; MIKOVA *et al.*, 2001; NAUYEN *et al.*, 2002), as quais terão como alvo substratos neuronais, provocando uma síndrome depressiva, conforme figura 3 (MAES *et al.*, 1992; 1992b; 1993e; KELLEY *et al.*, 2003; MAES *et al.*, 2012).

Conforme previamente mencionado, as respostas inflamatórias centrais são geralmente mantidas por microglia e astrócitos ativados (HENEKA *et al.*, 2010; BUFFO *et al.*, 2010; JURGENS & JOHNSON, 2012). Microglia e astrócitos são células imunes residentes do cérebro, as quais se proliferam e tornam-se imunocompetentes secretando uma série de moléculas citotóxicas e neurotróficas (WALTER & NEUMANN, 2009; KITAMURA *et al.*, 2009; POLLAZI & MONTI, 2010). Assim, a microglia tem fenótipos diferentes de ativação, que dependem do estímulo inflamatório, os quais são M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) (COLTON, 2009; COLTON E WILCOCK, 2010; FRANCO & FERNANDEZ- SUAREZ, 2015). A

microglia M1 promove respostas pró-inflamatórias, como produção e liberação de  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , produção de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (LE *et al.*, 2001; BLOCK *et al.*, 2007; AUDET *et al.*, 2011; PATKI *et al.*, 2013), contribuindo para uma disfunção da rede neural. Por outro lado, a microglia M2 está associada a uma regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias, produção de fatores neutróficos e de crescimento, desempenhando um papel na restauração da homeostase, envolvida na neuroproteção (PONOMAREV *et al.*, 2007; POLLAZI & MONTI, 2010).

A esse respeito, microglia e astrócitos exercem efeitos imunomoduladores (MILLER, 2003; DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJANH *et al.*, 2005; LYNCH, 2009), possuindo propriedades neuroinflamatórias e neuroprotetoras. Os astrócitos desempenham um papel fundamental na recuperação de uma lesão cerebral, regulando as moléculas antioxidantes e fatores neutróficos (HENEKA *et al.*, 2010; BUFFO *et al.*, 2010; JURGENS & JOHNSON, 2012). Os astrócitos ativados modulam funções microgliais, tais como proliferação celular, migração, adesão e ativação (GODBUT *et al.*, 2005; BARRIETOS *et al.*, 2006; ABRHAM *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que os astrócitos podem reduzir os efeitos potencialmente prejudiciais da microglia (GAYKEMA *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; LYNCH, 2009).

Figura 3: Fisiopatologia da depressão desencadeada pela inflamação.



Fonte: FELGER & LOTRICH, 2013.

Com isso, várias evidências sugerem que a inflamação desempenha um papel na fisiopatologia da depressão (HASHIMOTO, 2009, 2015, MILLER *et al.*, 2009, RAISON *et al.*, 2010, DANTZER *et al.*, 2008, ZHANG *et al.*, 2016), inclusive em disfunções cognitivas, emocionais e ansiedade (LEONARD & SONG, 1996; HEYSRR *et al.*, 1997; ANISMAN & MERALI, 1999; VALLIERES *et al.*, 2002). Desse modo, as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 mostram um efeito direto sobre a neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica (DUNN *et al.*, 2005, SCHIEPERS *et al.*, 2005, HAASE & BROWN, 2015). Assim, as citocinas pró-inflamatórias podem influenciar a síntese e a recaptação de 5-HT e NA, levando à sua redução nos níveis extracelulares (MCNAMEE *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2014). Nesse contexto, estudos envolvendo pacientes deprimidos demonstraram que possuem o sistema imunitário desregulado, caracterizado pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (CONNOR & LEONARD, 1998; MAES *et al.*, 1999; MIKOVA *et al.*, 2001). Portanto, várias ações das citocinas alteram funções do organismo, tais como febre, anedonia, alterações neuroendócrinas, alterações no sono e outras alterações comportamentais (atividades exploratórias, sexuais e sociais) (MAES, 1999; LEONARD & SONG, 1999). Portanto, as citocinas podem desempenhar um papel importante no aparecimento de comportamentos depressivos (KONSMAN *et al.*, 2008; YIRMIYA & GOSHEN, 2011).

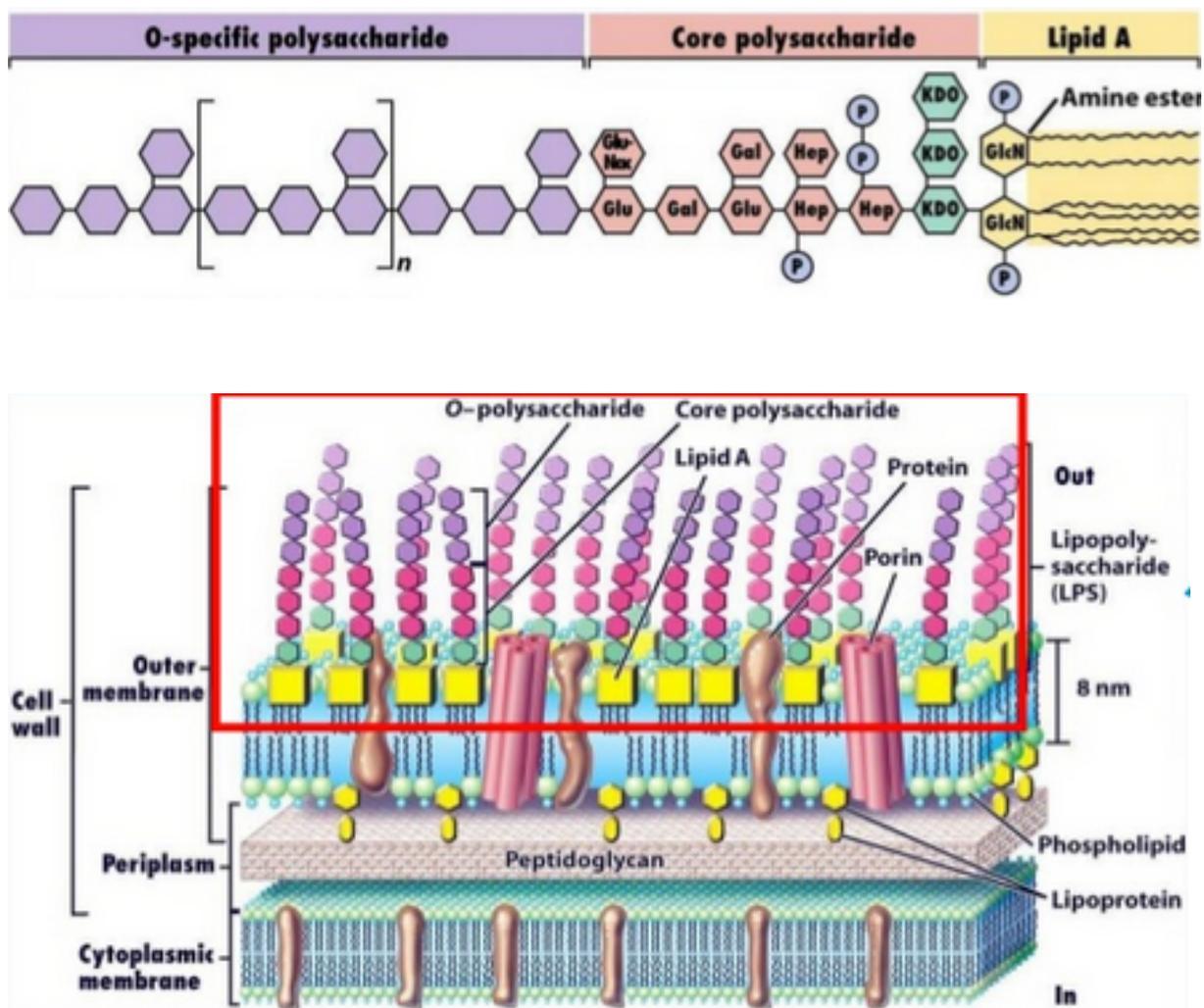
Todos esses achados sugerem que a inflamação tem um papel importante na etiologia do humor depressivo e que os sinais pró-inflamatórios podem atuar nos processos fisiopatológicos que caracterizam os distúrbios depressivos, pelas vias imuno-inflamatórias, metabolismo dos neurotransmissores, neuroendócrina, plasticidade sináptica (RAISON *et al.*, 2006), estresse oxidativo e nitrosativo e neurodegeneração (MAES *et al.*, 1993; SEIDEL *et al.*, 1995; SLUZEWSKA *et al.*, 1996; MAES *et al.*, 2009, 2011a; LEONARD & MAES, 2012; MOYLAN *et al.*, 2013).

### 2.3 O papel do LPS na Depressão

O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da parede celular externa de bactérias Gram-negativas, como por exemplo a *Escherichia coli*, funcionando como uma endotoxina bacteriana que estimula o sistema imune inato de forma semelhante a uma infecção bacteriana (BISWAS & LOPEZ-COLLAZO, 2009). O LPS induz uma cascata de processos imunológicos que contribuem para uma série de respostas fisiológicas, metabólicas, neuroendócrinas e comportamentais (HART, 1990; DANTZER, 2001).

O LPS é constituído por três porções: a) o lipídio A, considerado a parte inicial da molécula e a sua porção tóxica, sendo a principal porção responsável pelas propriedades pró-inflamatórias do LPS, formado principalmente de açúcares (glicosamina) ligado a fosfatos e longas cadeias de ácidos graxos, cada uma com cerca de 14 átomos de carbono; b) o polissacarídeo O, uma cadeia variável situada na superfície externa da molécula, o qual é responsável por mudanças conformacionais das bactérias Gram-negativas; e c) a terceira porção também conhecida como região nuclear que liga as porções interna e externa da molécula, sendo a porção de LPS reconhecida pelos anticorpos (RAETZ, 1991) (Fig. 4). Os patógenos bacterianos entéricos contendo antígenos O, como um componente do LPS, podem promover resistência e fagocitose, aumentando a patogenicidade dos membros da família *Enterobacteriaceae*, a qual pertence à espécie *Escherichia coli* (HART, 1988; SWIERGIEL *et al.*, 1999).

Figura 4 – Estrutura química do LPS.



Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABrwUAL/bacterias>

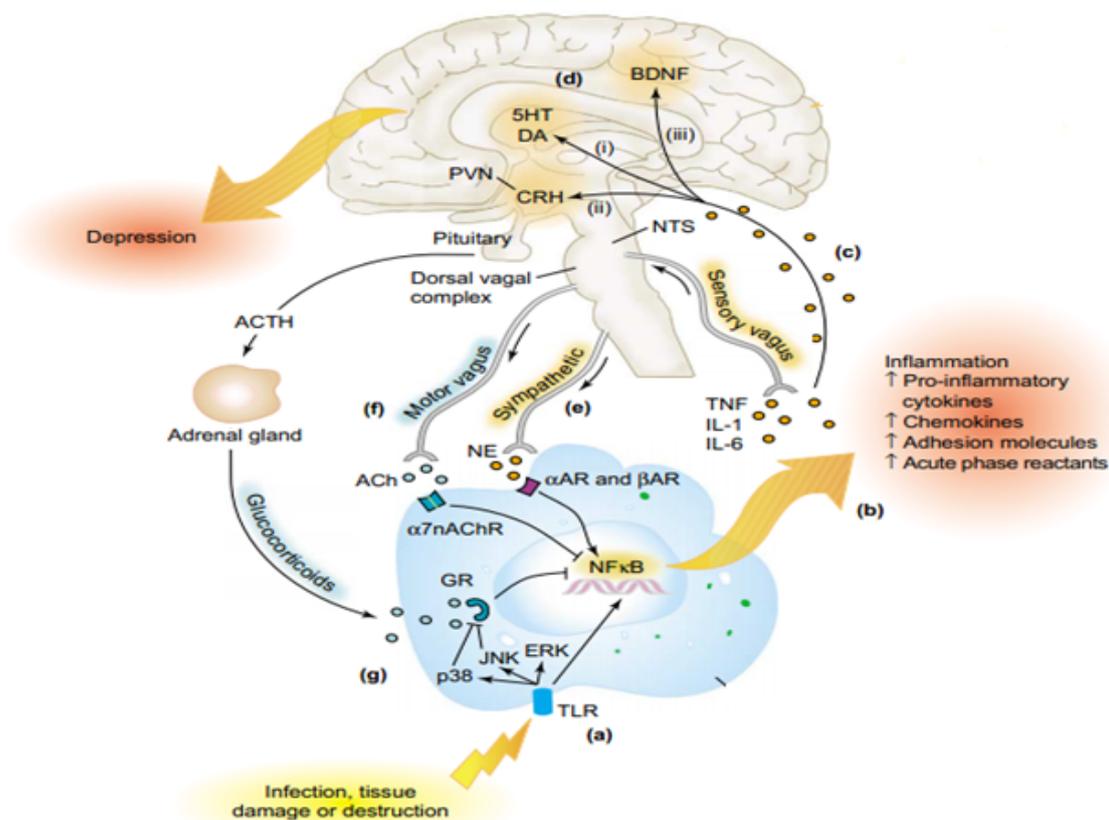
A esse respeito, uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria Gram-negativa, como *E. coli*, ou pela administração direta do mesmo, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado. Desse modo, o LPS que se encontra no plasma liga-se a uma proteína de fase aguda do hospedeiro, o LBP (proteína ligadora de LPS), produzida no fígado, formando um complexo chamado de LPS-LBP (SCHUMANN *et al.*, 1990; HEUMANN *et al.*, 1990; MATHISON, 1992; WURFELL *et al.*, 1995; YU, 1997; CHABY, 1999; KITCHENS *et al.*, 1999). O complexo transfere o LPS para a proteína de membrana periférica CD14 para a superfície de células imunológicas, na superfície dos macrófagos, iniciando a ativação celular (ANDERSON *et al.*, 1992; FENTON & GOLENBOCK, 1998; ADEREM & ULEVITCH, 2000; MIYAKE, 2003).

Por conseguinte, o novo complexo formado, chamado de LPS-CD14, ativa a sinalização do receptor *Toll-like*, tipo 4 (TLR-4) (MEANS *et al.*, 2000; ANDERSON, 2000; BEUATLER, 2001), que tem um papel fundamental no reconhecimento de antígenos patogênicos, ao qual é complexada à proteína MD-2, gerando o sinal transmembranar para o núcleo (JEAN-BAPTISTE, 2007). Assim, dentro do macrófago ocorre uma série de reações em cascata celulares, incluindo a atuação de MyD88, p38, JNK, TAK-1, proteína quinase I $\kappa$ B, proteína ativadora 1 (AP-1), até a ativação do fator nuclear de transcrição NF- $\kappa$ B (envolvido no desenvolvimento, plasticidade e neurodegeneração em neurônios e células da glia), que ativa os genes que codificam as proteínas envolvidas na defesa contra a infecção, que são as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) (INGALLS *et al.*, 1995; ADEREM & ULEVITCH, 2000; HAVA *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2007; JEAN-BAPTISTE, 2007). Essa endotoxina bacteriana pode atuar em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais (SALUK-JUSZCZAK & WACHOWICZ, 2005).

Durante um episódio inflamatório, as reações inflamatórias consistem em cascatas celulares a uma resposta de fase aguda. Assim, após exposição ao LPS, ocorre uma secreção elevada de citocinas pró-inflamatórias periféricas, quimiocinas, moléculas de adesão, produção de ciclooxigenase 2 (COX-2) e prostaglandinas, resultando em uma inflamação periférica (CUNNINGHAM & SANDERSON, 2008; BILBO *et al.*, 2008; TARR *et al.*, 2011). Além disso, o LPS ativa células da glia, como microglia e astrócitos. A microglia ativada estimula a produção de citocinas e mediadores inflamatórios através de diferentes vias no SNC (HENEKA *et al.*, 2010; BUFFO *et al.*, 2010; JURGENS & JOHNSON, 2012). Assim, a indução de mediadores pró-inflamatórios afeta o metabolismo de neurotransmissores, como 5-HT e DA (DUNN, 1988; KABIERSCH *et al.*, 1988, DUNN, 2006) a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), ocorrendo um aumento de concentrações de ACTH e glicocorticóides (BESEDOVSKY *et al.*, 1986; DUNN, 2000) e uma diminuição de fatores neurotróficos, produção da enzima óxido nítrico sintase induzida, evidenciando uma neuroinflamação e danos neuronais (SCHNYDRIG *et al.*, 2007; BILBO *et al.*, 2008). Portanto, uma ativação inflamatória neural causa um amplo espectro de efeitos neuroimunes, neuroquímicos e neuroendócrinos, levando

à indução de uma sintomatologia depressiva, conforme figura abaixo (PITYCHOUTIS & PAPADOPOULOU-DAIFOTI, 2010).

Figura 5 – Mecanismos inflamatórios do LPS.



Fonte: RAISON *et al.*, 2006.

Nesse sentido, as vias inflamatórias desencadeiam um complexo de sintomas, como *sickness behavior* (comportamento de doença) e comportamentos depressivos, incluindo anedonia, anorexia, distúrbios psicomotores, ansiedade, fadiga, distúrbios de memória e comprometimento neurocognitivo (QIN *et al.*, 2007; JOHNSON, 2002; KELLEY *et al.*, 2003; MAES *et al.*, 2012). Assim, tem sido demonstrado que o LPS exerce efeitos de ansiedade em animais testados em ambientes claro-escuro e testes do labirinto (SWIERGIEL & DUNN, 2007). Estudos relataram que uma dose baixa de LPS foi eficaz na indução de comportamentos tipo-depressivos em animais, sendo suficientemente elevada para ativar no cérebro os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos (LINTHORST & REUL, 1998; LACOSTA *et al.*, 1999). Esses neurotransmissores têm sido implicados na resposta

ao estresse, medo e ansiedade, podendo ser mediadores dos efeitos de LPS (MILLAN, 2003; WIECZOREK *et al.*, 2005).

Evidências também mostram que a estimulação do sistema imune inato por administração periférica de LPS induz profundas alterações centrais monoaminérgicas em animais (LINTHORST *et al.*, 1995, LINTHORST & REUL, 1998; DANTZER *et al.*, 2008). Em seu estudo, O'Connor *et al.*, 2009, demonstrou que as alterações induzidas na atividade serotoninérgica podem ser atribuídas à ativação induzida por LPS da enzima indolamina 2,3-dioxenase (IDO) no cérebro, desenvolvida com triptofano. Dado que o triptofano é a molécula precursora limitante da taxa na biossíntese de 5-HT, a hipótese é de que as alterações no seu metabolismo possam explicar o desenvolvimento dos sintomas depressivos (DANTZER *et al.*, 2008). Além disso, verificou-se também que a administração da endotoxina bacteriana aumenta o metabolismo da DA na maioria das regiões do cérebro em roedores (DUNN, 1992; DUNN *et al.*, 2005).

Conforme mencionado anteriormente, o desafio imune por LPS induz mudanças comportamentais e deficiências cognitivas em modelos inflamatórios (ANISMAN *et al.*, 2002). Essas alterações comportamentais estão relacionadas com o tempo de administração (DANTZER *et al.*, 2008) e dose-dependente (ENGELAND *et al.*, 2001; FRANKLIN *et al.*, 2003; LOCKEY *et al.*, 2009). Uma ocorre durante o pico das citocinas inflamatórias, cerca de 1,5h após administração do LPS, a ser referido como *sickness behavior* (comportamento de doença) (CUSTODIO *et al.*, 2013). O outro pico ocorre após 24h do desafio com LPS, relacionando com um comportamento tipo-depressivo (MELLO *et al.*, 2013). Em relação à dose-dependente, altas e baixas doses da endotoxina bacteriana provocam respostas inflamatórias (CHEN, 2005; BISWAS & LOPEZ-COLLAZO, 2009; MAITRA *et al.*, 2012; MORRIS & LI, 2012), através da modulação dos mediadores inflamatórios a iniciação e propagação de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, Mal de Parkinson e outras síndromes inflamatórias crônicas (QIN *et al.*, 2007; MORENO-NAVARRETE *et al.*, 2009; MANCO *et al.*, 2010; WIESNER *et al.*, 2010; MAITRA *et al.*, 2012).

## 2.4 O Envolvimento do Estresse Oxidativo na Depressão

Os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica em nosso organismo. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ROS (espécies reativas de oxigênio) ou RNS (espécies reativas de nitrogênio) (WALKO *et al.*, 2007). Essas espécies desempenham um duplo papel como espécies deletérias e benéficas, uma vez que podem trazer benefícios ou prejuízos ao organismo (WALKO *et al.*, 2006). Desse modo, os efeitos benéficos das ROS ocorrem em concentrações baixas a moderadas e envolvem papéis fisiológicos nas respostas celulares, como na defesa contra agentes infecciosos e na função de vários sistemas de sinalização celular. Porém, o desequilíbrio da produção elevada de ROS/RNS e uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos desencadeia o estresse oxidativo e nitrosativo (KOVACIC & JACINTHO, 2001; WALKO *et al.*, 2001; RIDNOUR *et al.*, 2005).

O organismo humano sofre ação constante de ROS e RNS geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou mesmo provenientes dos alimentos. Nesse sentido, as principais ROS são: hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}^-$ ) e alcóxila ( $\text{RO}^-$ ), oxigênio ( $\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ). Dentre as RNS incluem-se nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) (WALKO *et al.*, 2007). Assim, os radicais livres são gerados nas mitocôndrias ou na membrana e seu alvo celular está relacionado com seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997; CADENAS & SIES, 1998). Encontram-se envolvidos em funções vitais ao organismo, como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, o excesso desses radicais geram danos biológicos potenciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (FINKEL, 2000). Por essa razão, o estresse oxidativo e nitrosativo são relacionados com a patogênese de várias doenças, envolvendo câncer, doenças cardiovasculares, artrite, distúrbios neurológicos, diabetes, lesão de isquemia/reperfusão, disfunções cognitivas, distúrbios neurodegenerativas, doenças

inflamatórias e envelhecimento, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral da doença (DHALLA *et al.*, 2000; SAYRE *et al.*, 2001; JENNER, 2003; DALLE-DONNE *et al.*, 2006; WALKO *et al.*, 2007).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio (ROS), porém a membrana é um dos mais atingidos, em decorrência da peroxidação lipídica, que acarretam alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer, de doenças neurodegenerativas e inflamatórias (NAKAMURA & LIPTON, 2009).

Há evidências de que a depressão clínica é acompanhada pela ativação de mecanismos imuno-inflamatórios, oxidativos e nitrosativos (MAES *et al.*, 1995; MAES, 2011a; KUBERA *et al.*, 2011b; LEONARD & MAES, 2012; KUBERA *et al.*, 2013). Nesse contexto, estudos revelam que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia da ansiedade e da depressão (BOUAYED *et al.*, 2009; SULAKHIYA *et al.*, 2014; GRASES *et al.*, 2014). Assim, o aumento da peroxidação lipídica, redução nos níveis de atividades enzimáticas antioxidantes e defesas antioxidantes, como GSH, catalase e dano ao DNA têm sido relatados (BOUAYED *et al.*, 2009; CUSTODIO *et al.* 2013; GRASES *et al.*, 2014; JANGRA *et al.*, 2014).

Evidências também têm sido apresentadas acerca do papel do óxido nítrico (NO) em alguns processos patológicos no SNC, por exemplo, dano isquêmico-hipóxico, e desordens neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson (MONCADA *et al.*, 1991; WALKO *et al.*, 2007). Nesse contexto, o nitrito é frequentemente utilizado como marcador do NO (FLATOW *et al.*, 2013), pois em solução aquosa, o NO reage com o oxigênio molecular e se acumula no plasma/soro como os íons nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (KOLTUKSUZ *et al.*, 2000).

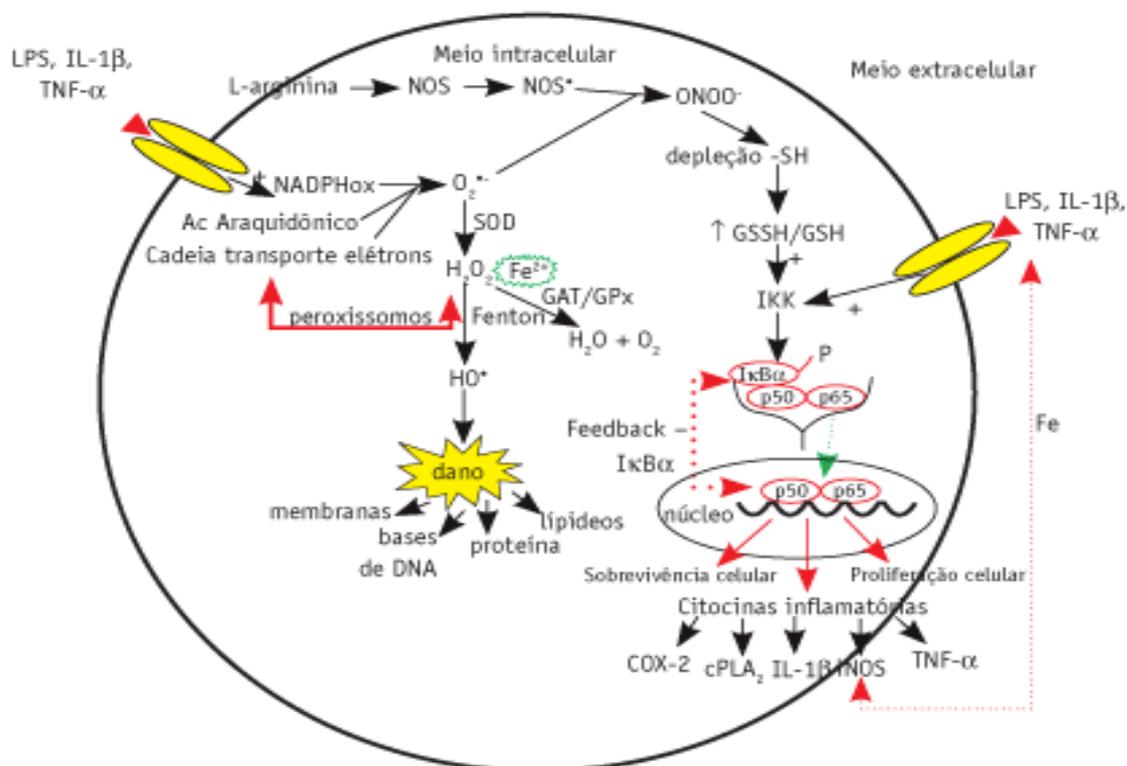
O NO funciona como mensageiro intracelular de produção endógena que desempenha um importante papel em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo regulação imune e regulação da pressão arterial, mecanismos

de defesa, neurotransmissão, como transmissão neuronal e plasticidade sináptica (BERGENDI *et al.*, 1999). Assim, a superprodução de RNS é evidenciada pelo estresse nitrosativo (KLATT & LAMAS, 2000; RIDNOUR *et al.*, 2004). Desse modo, o estresse nitroso pode levar a reações de nitrosilação que podem alterar a estrutura das proteínas e, assim, inibem sua função normal. Em determinadas condições, o (NO) e o ( $O_2^-$ ) podem interagir, resultando em um produto muito tóxico, peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é capaz de reagir rapidamente com diversas moléculas (proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos), danificando-as (CARR *et al.*, 2000). Além disso, outras RNS, como ( $OH^-$ ), dióxido de nitrogênio, possuem semelhante potencial deletério, como fragmentação do DNA e oxidação lipídica e têm sido associadas a diversos processos patológicos (WANG *et al.*, 2002).

Os mecanismos de defesas também são desenvolvidos através da exposição de radicais livres (CADENAS, 1997). Esses mecanismos contra o estresse oxidativo, envolvem: (i) mecanismos preventivos, (ii) mecanismos de reparação, (iii) defesas físicas e (iv) defesas antioxidantes. Assim, as defesas antioxidantes enzimáticas incluem superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e antioxidantes não enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico, vitamina E, glutathione reduzida (GSH), carotenóides, flavonóides e outros antioxidantes (NOGUEIRA *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2000). Em condições normais, existe um equilíbrio entre as atividades e os níveis intracelulares desses antioxidantes, o qual é essencial para a sobrevivência dos organismos (MASELLA *et al.*, 2005).

Portanto, o estresse oxidativo e nitrosativo associados à inflamação são fatores causais para o declínio progressivo das funções motoras e cognitivas (OPARA, 2006; MUR *et al.*, 2008; CACILHAS *et al.*, 2009). Nesse contexto, o estresse fornece uma ligação entre o dano oxidativo e a inflamação sistêmica. Os neurônios e células da glia são particularmente vulneráveis a processos inflamatórios e estado redox (ZHANG & KAUFMAN, 2006; BOULANGER, 2009). Assim, após um insulto provocado pelo LPS, ocorre a ativação microglial, sendo como principal fonte de oxidação celular de produtos, bem como ativação de NADPH-oxidase, além do excesso de produção de ROS e moléculas pró-inflamatórias no cérebro, conforme figura 6 (PAWATE *et al.*, 2004; QIN *et al.*, 2005; HAYASHI *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Figura 6 - Após o estímulo extracelular por LPS ou citocinas pró-inflamatórias, ocorre a formação de ROS e RNS.



Fonte: FILIPPIN *et al.*, 2008.

A esse respeito, estudos têm evidenciado que as ROS, derivadas da respiração mitocondrial, atuam como moléculas de sinalização para acionar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , através da ativação da cascata dependente do fator nuclear kB (NF-kB), às respostas inflamatórias (ZHOU *et al.*, 2011; NAKAHIRA *et al.*, 2011). Além disso, a administração de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6; IFN- $\gamma$  e fatores de crescimento geram concentrações elevadas de ROS e RNS em células fagocíticas (ZOU & CREWS, 2005), conseqüentemente medeiam funções celulares importantes, como indução e manutenção de caminhos de transdução de sinal envolvidos no crescimento, proliferação e diferenciação celular e apoptose, em condições patológicas (THANNICKAL & FANBURG, 2000; DROGE, 2002; DIKALOV *et al.*, 2004; STORZ, 2005).

Ademais, a ativação de macrófagos e microglia no SNC, contribuem para a produção de mediadores oxidativos e neuroativos que podem influenciar o

comportamento semelhante à depressão (LEONARD & MAES, 2012; MAES *et al.*, 2012c). Por exemplo, citocinas inflamatórias no SNC sobrerregulam a enzima IDO, a qual metaboliza o triptofano em L-quinurenina. Portanto, níveis reduzidos de triptofano irão influenciar a síntese da serotonina. Assim, a produção elevada de mediadores neuroativos, incluindo 3-hidroxiquinurenina e ácido quinolínico induzem danos neuronais por estresse oxidativo. Nesse sentido, estudos demonstraram um importante mecanismo de complicações do comportamento de humor com a inflamação, devido à degradação do triptofano, impactando nas vias serotoninérgicas e glutamatérgicas (DANTZER *et al.*, 2008; NG *et al.*, 2008).

Portanto, a indução da via O&NS pode se desenvolver quando a produção de ROS/RNS for muito alta e/ou as defesas antioxidantes diminuam. Assim, o transtorno depressivo maior é evidenciado por níveis aumentados de ROS/RNS e danos mediados por O&NS ao DNA, proteínas, ácidos graxos e mitocôndrias, bem como baixos níveis de antioxidantes, como coenzima Q10, zinco e GSH (PEET *et al.*, 1998; MAES *et al.*, 1999a,b; MAES *et al.*, 2000; BILICI *et al.*, 2001, IRIE *et al.*, 2003; KHANZODE *et al.*, 2003; MAES *et al.*, 2011a; LEONARD & MAES, 2012).

## **2.5 Participação de Mecanismos Inflamatórios pelas vias NF- $\kappa$ B, ERK, GSK, IBA-1 e CREB.**

Há crescentes evidências que a sinalização intracelular no sistema nervoso central fornece novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios, neurodegenerativos e de plasticidade que ocorrem ou que estão comprometidos em uma série de doenças neurológicas e psiquiátricas (MATTSON, 1998; PENNYPACKER, 1998; GORENSTEIN *et al.*, 2000).

Uma das vias envolvidas na resposta inflamatória de distúrbios neurodegenerativos é a ativação microglial (COLTON, 2009; COLTON & WILCOCK, 2010). A esse respeito, sabe-se que as células gliais (incluindo microglia e astrócito) são uma fonte importante de citocinas inflamatórias do SNC (RANSOHOFF & BROWN, 2012). Portanto, a microglia ativada, através de agentes estressores, pode secretar mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 e fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), a produção de óxido nítrico sintase

induzida (iNOS) e as espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo para a disfunção da rede neural (LE *et al.*, 2001; BLOCK *et al.*, 2007). Com isso, o marcador de molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada-1 (IBA-1) é expresso quando ocorre a ativação da microglia (PONOMAREV *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2017).

Após a ativação da microglia, identificou-se a ativação da via inflamatória do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Vários estímulos ativam este fator, entre os quais estão os neurotransmissores (como o glutamato), neurotrofinas, proteínas neurotóxicas ( $\beta$ -amilóide), citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), glicocorticóides, produtos provenientes de vírus e bactérias (LPS), irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997). Independentemente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio, pelo estresse oxidativo e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF- $\kappa$ B. A estimulação ocorre através da cascata dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), a qual irá ativar a proteína quinase TAK1. Esta por sua vez, ativa o complexo de quinase IKK, a qual irá degradar a proteína inibitória kappa B (I $\kappa$ B), ocorrendo a ativação, por fosforilação, do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Assim, ocorre a translocação desse fator do citoplasma para o núcleo (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; BALDWIN, 1996).

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é conhecido por um regulador crítico de respostas imediatas à agentes patogênicos, sendo uma via central do sistema imunológico, na participação essencial da montagem de respostas imunes inata e adaptativa e também desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular, sobrevivência e apoptose (SCHNEIDER *et al.*, 1999). Nesse contexto, esse fator regula a transcrição dos genes alvo envolvidos na inflamação, como genes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, iNOS, IFN- $\gamma$  (JANSSENS & BEYAERT, 2003; AKIRA *et al.*, 2006; MUROI & TANAMOTO, 2008). Estudos anteriores demonstraram que o LPS, reconhecido pelo TLR4, estimula o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$ , NO, através da ativação NF- $\kappa$ B mediada por MyD88 (HOEBE *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2003; SUGIYAMA *et al.*, 2008; SUGIYAMA *et al.*, 2010).

Outro mecanismo importante envolvido na fisiopatologia da depressão são as vias de sinalização que regulam a sobrevivência e neuroplasticidade celular, bem como a resposta a antidepressivos, como a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a proteína quinase serina/treonina (AKT), a enzima glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (BEAULIEU *et al.*, 2009). Nesse sentido, a via PI3K/AKT atua na regulação da atividade GSK-3 $\beta$ , levando à sua inativação, através da fosforilação direta no resíduo de Serina9-GSK-3 $\beta$  (GRIMES & JOPE, 2001; BEAULIEU *et al.*, 2009).

Há evidências que GSK-3 $\beta$  está envolvida na neuroinflamação, em doenças como Mal de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2 e vários carcinomas (PEINEAU *et al.*, 2008; KANNINEN *et al.*, 2011; BEUREL, 2011), a qual tem como função a regulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, através dos sistemas imunes tanto inatos quanto adaptativos (WANG *et al.*, 2011a). Nesse contexto, estudos anteriores em modelos de animais em condições inflamatórias, forneceram evidências de uma série de conexões entre a GSK-3 $\beta$  e distúrbios do humor. Esses achados sugerem que a desregulação da GSK-3 $\beta$  promove a suscetibilidade aos transtornos do humor, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , após estimulação de vários TLRs e uma diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 (MARTIN *et al.*, 2005). Por outro lado, os inibidores da GSK3 $\beta$  reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, através da inibição do fator transcricional NF- $\kappa$ B, aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, diminuem a produção de NO e iNOS (JOPE *et al.*, 2007; JOPE, 2011).

Ademais, vários dos neuromoduladores que são evidenciados deficientes na depressão, como serotonina, BDNF e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), normalmente estimulam essas vias de sinalização que mantêm o controle inibitório da GSK-3 $\beta$ . Assim, a hipótese de que as deficiências nestes sinais na depressão deixaria GSK-3 $\beta$  inibida inadequadamente e que a restauração do seu controle inibitório por drogas terapêuticas é um componente importante das ações terapêuticas para tratar esses transtornos associados a inflamação (LI *et al.*, 2004). Assim, moduladores de serotonina, como a fluoxetina, regulam a GSK-3 $\beta$  inibindo sua atividade no cérebro, agindo como alvo terapêutico em transtornos psiquiátricos (POLTER & LI, 2011).

Outra via de sinalização intracelular envolvida no processo ou mecanismo inflamatório é a proteína quinase regulada extracelular (ERK 1/2), a qual está associada à patogênese e ao tratamento da depressão (GROVES, 2007; MATHEW *et al.*, 2008; PANDYA *et al.*, 2013). Assim, sinais extracelulares, como os fatores de crescimento ou BDNF, ativam a cascata Ras-Raf-MEK-ERK, ativando a ERK, através de sua fosforilação e translocação nuclear (HUANG & REICHARDT, 2003). Nesse contexto, a ERK 1/2 está envolvida na plasticidade sináptica, na transcrição de genes, como o fator de transcrição CREB e em eventos comportamentais (MAZZUCHELLI & BRAMBILLA, 2000; SWEATT, 2001; SELCHER *et al.*, 2001; MAZZUCHELLI *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2004; BLENDY, 2006).

Há evidências de estudos realizados anteriormente, da diminuição na expressão de ERK 1/2 em comportamentos tipo-depressivos em modelos de roedores (GUAN, 2013; KUO *et al.*, 2013; LEEM *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015). A esse respeito, um estudo relatou que a ativação e a expressão da ERK1/2 são reduzidas nas áreas cerebrais *pós-mortem* de pacientes deprimidos (DWIVEDI *et al.*, 2001). Por outro lado, os antidepressivos podem aliviar os sintomas da depressão, através do aumento da expressão de ERK 1/2 total (LIU *et al.*, 2014) e da ERK 1/2 fosforilada (QI *et al.*, 2008; GOURLEY *et al.*, 2008; FIRST *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2013).

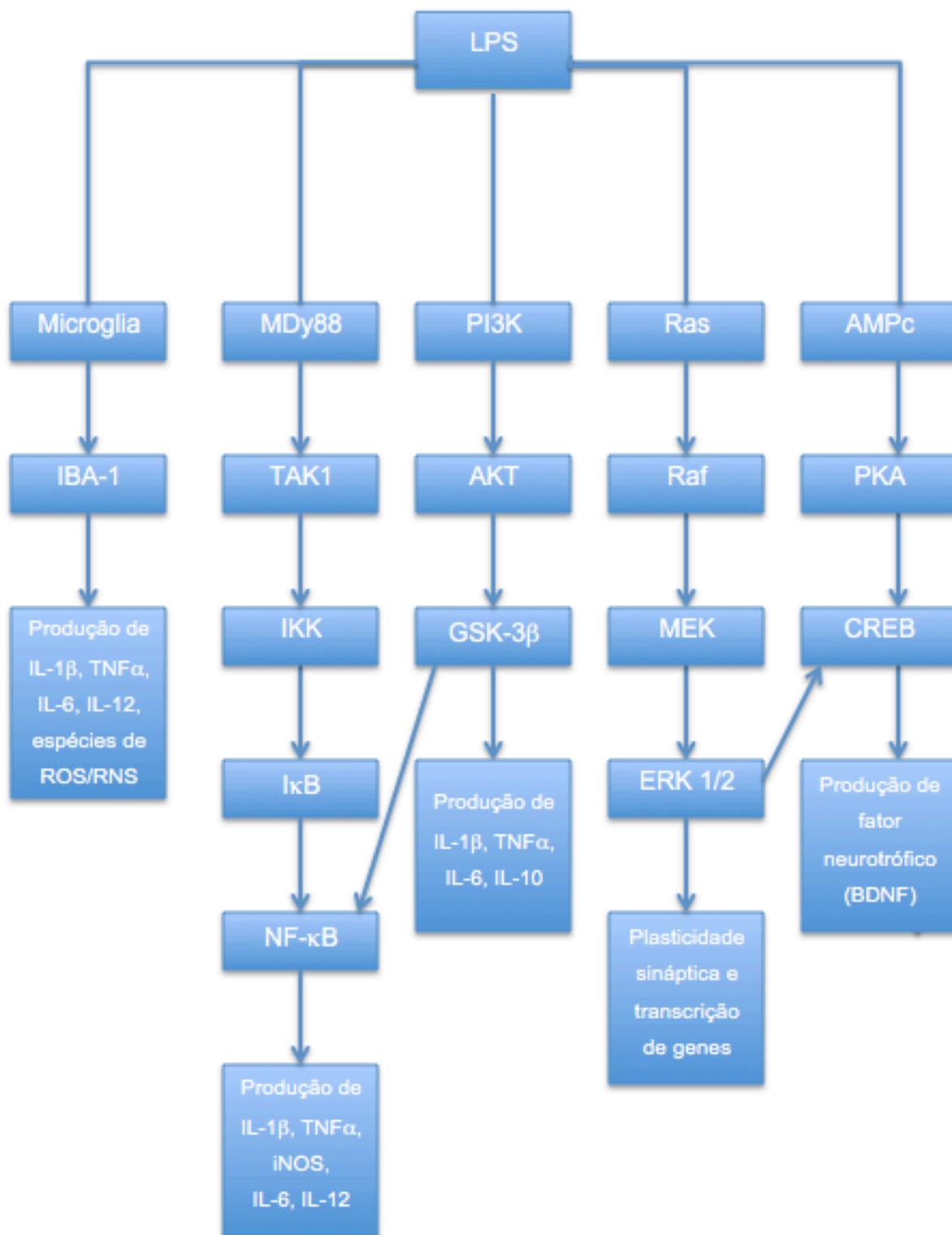
A fisiopatologia da depressão também pode ser mediada pela sinalização intracelular do fator transcripcional CREB, o qual está envolvido com *déficits* cognitivos, na aprendizagem e memória, nas regiões cerebrais (ABEL *et al.*, 1997; TAYLOR *et al.*, 1999; WALLACE *et al.*, 2009). A fosforilação de CREB pode ocorrer por meio da ativação da cascata de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e da proteína quinase A (PKA), mas também pela ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio (proteína quinase C e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina) (DUMAN *et al.*, 1997, 1999). Nesse contexto, a função do CREB é regulada pelo seu estado de fosforilação no Ser133, o que resulta na ativação da transcrição de genes alvo, como por exemplo, o fator neurotrófico BDNF (MONTMINY, 1990; MEYER & HABENER, 1993).

Estudos em modelos de animais evidenciaram uma diminuição dos níveis proteicos de CREB, após a exposição ao LPS, evidenciando um comportamento de depressão-símile nesses roedores (LIAO *et al.*, 2017; GE *et al.*, 2015). Nesse

contexto, um estudo realizado por Simona *et al.*, 2015, verificou que após o tratamento com LPS e TNF- $\alpha$  em células neuronais, houve uma diminuição dos níveis de expressão de CREB e consequentemente de BDNF. Após o tratamento com trazadona, antidepressivo atípico, aumentou os níveis dos fatores neurotróficos BDNF e de sua transcrição. Outros estudos evidenciaram que o tratamento com antidepressivo crônico aumentou a regulação de fosforilação de CREB (THOME *et al.*, 2000; KRISHMAN & NESTLER, 2008) e o aumento dessa ativação de CREB em modelos de animais com depressão, evidenciando efeitos neuroproterores dos antidepressivos (THOME *et al.*, 2000; BLENDY, 2006; SIMONA *et al.*, 2015).

Baseado em todas essas evidências, a figura abaixo demonstra a participação das vias intracelulares IBA-1, NF- $\kappa$ B, GSK-3 $\beta$ , ERK 1/2, CREB, após exposição ao LPS, o qual irá se ligar ao TLR4, desencadeando uma cascata inflamatória. Assim, durante um episódio inflamatório, é ativada uma resposta imune no SNC por citocinas e mediadores inflamatórios, como fatores neurotróficos, hormônios, fatores de crescimento, estresse oxidativo e nitrosativo, que sinalizam no cérebro através de diferentes vias. Além disso, o processo inflamatório afeta uma resposta neuronal, através da integridade neuronal, da proliferação celular e da plasticidade sináptica em regiões sensíveis ao estresse, como o hipocampo (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997; MATTSON, 1998).

Figura 7 - Mecanismos das vias intracelulares no processo inflamatório.



Fonte: elaborada pela autora.

## 2.6 Diferenças de gênero na Depressão

O gênero afeta muitos aspectos psicopatológicos, como a prevalência de distúrbios específicos, a expressão dos sintomas, o curso da doença, o comportamento e a resposta ao tratamento (AFIFI, 2007). Assim, homens e mulheres diferem na ocorrência e apresentação de vários distúrbios psiquiátricos (MCCARTHY *et al.*, 2005; KARATSOREOS & MCEWEN, 2011). Existe uma diferença de gênero na prevalência da depressão de 2:1, sendo mais prevalente nas mulheres que nos homens (NESTLER *et al.*, 2002; KOSKINAS *et al.*, 2002; KUEHNER, 2003; BERTON & NESTLER, 2006). Além disso, as mulheres apresentam preponderância de sintomas atípicos (ANGST *et al.*, 2002b; LAMERS *et al.*, 2010), ansiedade (CLAYTON *et al.*, 1991; WEICH *et al.*, 2001; DE GRAAF *et al.*, 2002) e transtornos psicossomáticos (SILVERSTEIN, 2002; MATZA *et al.*, 2003; MARCUS *et al.*, 2005, 2008; PENNELL *et al.*, 2012; SCHUCH *et al.*, 2014).

O dimorfismo sexual pode ser definido como as diferenças inerentes a cada gênero no que se refere às predisposições. Por exemplo, em funções cognitivas, como processamento, concentração, aprendizado, memória, têm sido demonstradas como sexualmente dimórficas na espécie humana, de modo que o gênero é um forte preditor de como tal habilidade específica pode ser desenvolvida (LINTHORST *et al.*, 1995; PITYCHOUTIS *et al.*, 2009; KORNSTEIN *et al.*, 2000; BERTON & NESTLER, 2006). Grande parte do controle das funções sexuais começa em ambos os gêneros com a secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas pelo hipotálamo, o qual promove a secreção pela adenohipófise de dois hormônios: hormônio folículo-estimulante e hormônio luteinizante, estimulando a produção de estrógeno, progesterona e testosterona. Esses hormônios estariam associados a aspectos comportamentais observáveis ao longo do desenvolvimento, corroborando a hipótese de que os padrões típicos de gênero estariam relacionados à produção hormonal (KRAEMER *et al.*, 2009).

Há fortes evidências que os hormônios sexuais agem como imunoreguladores nas respostas imunes, através das interações do sistema imunológico e neuroendócrino (SPINEDI *et al.*, 1994; OLSEN & KOVACS, 1996; SILVA, 1999; SCHAUENSTEIN *et al.*, 2000; LOSEL & WEHLING, 2003; PITYCHOUTIS *et al.*, 2009). Portanto, esses hormônios sexuais aparentemente desempenham um papel

importante nas diferenças de susceptibilidade associadas ao sexo em certas doenças infecciosas e auto-imunes (SPINEDI *et al.*, 1994; DE LEÓN-NAVA & MORALES-MONTOR, 2006). Nesse contexto, os modelos animais semelhantes à depressão, representam uma ferramenta útil para a investigação das diferenças sexuais na neurobiologia da depressão e da resposta antidepressiva (GAILLARD & SPINEDI, 1998; PITYCHOUTIS *et al.*, 2009; DALLA *et al.*, 2010; SENS *et al.*, 2017).

A esse respeito, as respostas comportamentais induzida por LPS têm sido referenciadas como diferencialmente expressas nos machos e fêmeas. É evidenciado que as fêmeas apresentam uma forte resposta imune em relação aos machos quando expostos a agentes patogênicos e possuem uma elevada proporção de sobrevivência contra infecções (WEINSTEIN *et al.*, 1984; VERTHELYI, 2001). Também é verificada esse padrão específico do sexo nas áreas cerebrais, onde as fêmeas mostraram um aumento da resposta imune central contra inoculação cerebral de agentes bacterianos e virais (BARNA *et al.*, 1996; SOUCY *et al.*, 2005; KLEIN, 2012). No entanto, apesar das fêmeas, inicialmente, montarem uma resposta imune mais vigorosa, sua resposta anti-inflamatória e de recuperação também é mais rápida (BOUMAN *et al.*, 2005; DARNALL & SUAREZ, 2009). Essas diferenças na responsividade do sistema imunológico têm sido associadas aos distintos efeitos de hormônios sexuais em órgãos e células imunes.

Como mencionado anteriormente, os hormônios influenciam a resposta imune, modulando a sinalização inflamatória. Nesse sentido, a testosterona parece ser imunossupressora, uma vez que deprime a função imunológica dos macrófagos (WICHMANN *et al.*, 1997; OLSEN & KOVACS, 2001), enquanto que os estrogênios são conhecidos por atuar como potenciadores imunes imunológicos ou imunossupressores, dependendo do componente imune medido e do tempo de avaliação da resposta imune. Nesse sentido, os estrógenos parecem interagir com os fatores imunes de transcrição, influenciando a maturação dos linfócitos e aumentando a produção de anticorpos (BOUMAN *et al.*, 2005; DARNALL & SUAREZ, 2009), contribuindo para que as fêmeas tenham reações imunes celulares e humorais mais intensas e se recuperem mais rapidamente das infecções que os machos (PENNEL *et al.*, 2012).

Entretanto, a influência do sexo nas respostas comportamentais à depressão induzida por LPS não é totalmente estabelecida. Nesse sentido, alguns estudos

indicaram uma maior sensibilidade das fêmeas aos efeitos do LPS e citocinas em relação aos aspectos comportamentais, tais como atividade sexual, recompensa de sacarose e consumo de alimentos (AVITSUR & YIRMIYA, 1999; MERALI *et al.*, 2003). Por outro lado, um outro estudo realizado por Marriott *et al.*, 2006, verificou que os machos produzem níveis mais elevados de citocinas inflamatórias em relação as fêmeas. Portanto, os influência do sexo nos efeitos comportamentais do LPS mudam acentuadamente de acordo com a dose do LPS, tempo de avaliação e espécie testada (BADALÀ *et al.*, 2008; CAI *et al.*, 2016).

## 2.7 Tratamento farmacológico da Depressão

Baseado na descoberta das teorias monoaminérgicas da depressão, várias classes de antidepressivos, como os inibidores de recaptção de serotonina (ISRS), inibidores da monoamina oxidase, inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina e inibidores seletivos de recaptção de dopamina, funcionam para reduzir os sintomas depressivos em pacientes com transtorno depressivo maior (MAES *et al.*, 1997; UHER *et al.*, 2014). Os efeitos terapêuticos iniciam-se após semanas de tratamento na maioria dos pacientes e aproximadamente um terço desses pacientes apresenta uma melhora significativa na resposta ao primeiro tratamento do antidepressivo (TRIVEDI *et al.*, 2006).

Além disso, novas estratégias terapêuticas estão sendo estudadas para o tratamento da depressão, baseadas no fato que os antidepressivos podem agir em várias vias interrelacionadas na fisiopatologia da depressão, atuando como: a) propriedades anti-inflamatórias; b) atenuante da ativação imune mediada por célula, reduzindo a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e aumentando citocina anti-inflamatória IL-10; c) redutor da via O&NS, incluindo a diminuição da peroxidação lipídica; d) na melhora nas defesas antioxidantes, pelo aumento da glutathiona reduzida; e) incrementador da geração de energia mitocondrial e protetor das mitocôndrias e f) limitador dos processos neuroprogressivos, como apoptose e neurogênese (MAES *et al.*, 2012). Portanto, a depressão como sendo uma doença inflamatória, possui um novo alvo nas terapias antidepressivas, baseado em seus efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores.

Nessa mesma linha de descobertas, diversos estudos têm demonstrado o papel dos antidepressivos na resposta inflamatória, com resultados indicando a diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e mudança de padrão de linfócitos T helper, de linfócitos T helper Th1 para Th2, os quais são anti-inflamatórios e protetores. Por conseguinte, a neuroproteção e/ou proliferação de células neuronais seria o mais provável mecanismo molecular da terapia antidepressiva, já que o tratamento crônico com antidepressivos também é responsável pelo aumento de fatores neurotróficos, como o BDNF (NISHIDA *et al.*, 2002; CASTREN *et al.*, 2007; MULLER & SCHWARZ, 2007).

Há evidências que os antidepressivos exercem parte da sua eficácia através da supressão das vias inflamatórias. Um estudo realizado por Xia *et al.*, 1996, verificou que os antidepressivos tricíclicos suprimiram a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em células de monócitos. Em outro estudo envolvendo modelos de animais semelhantes à depressão, os antidepressivos seletivos de serotonina bloquearam a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (KUBERA *et al.*, 2011). No mesmo modo, o antidepressivo bupropiona, da classe de inibidores de recaptção de noradrenalina e dopamina, reduziu a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em modelo de animal induzido por LPS (BRUSTOLIM *et al.*, 2006). Outro antidepressivo venlafaxina, inibidor seletivo da recaptção da serotonina e da noradrenalina, apresentou efeitos antiinflamatórios através da supressão da razão de produção de IFN- $\gamma$ /IL-10, ou seja, pela diminuição de produção de IFN- $\gamma$  e aumento da liberação de citocina antiinflamatória IL-10 (KUBERA *et al.*, 2001).

Portanto, os antidepressivos bloqueiam a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo a inflamação periférica e central, através dos seus efeitos antiinflamatórios, melhorando os sintomas depressivos evidenciado no transtorno depressão maior. Desse modo, os ISRS representam a primeira escolha para o tratamento farmacológico da depressão moderada a grave (ALBONI *et al.*, 2016).

### 2.7.1 Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS)

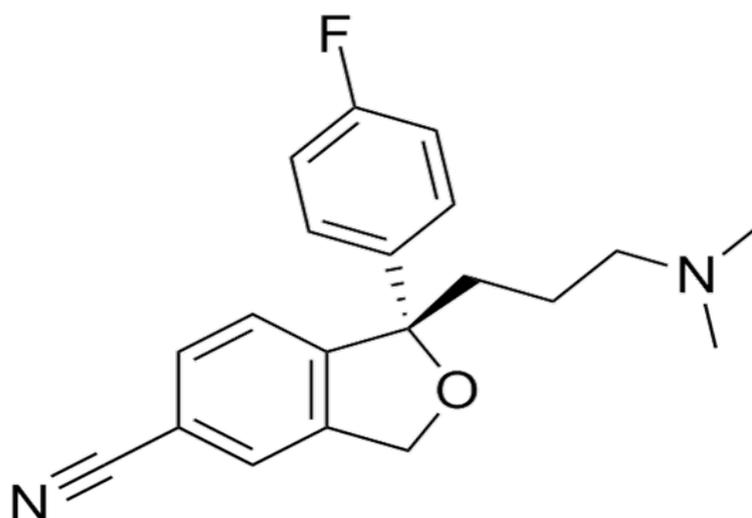
Os ISRS foram desenvolvidos a partir dos antidepressivos tricíclicos, os quais foram assim classificados devido a sua baixa afinidade pelos receptores adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos e maior afinidade pelo bloqueio das proteínas de recaptação de serotonina. Os ISRS são geralmente bem tolerados em doses terapêuticas e praticamente isentos de risco em cardiopatas, quando comparados com os antidepressivos tricíclicos. Por outro lado, os efeitos colaterais estão relacionados com sua ação química, ou seja, efeitos serotoninérgicos, como insônia, náuseas, vômitos, diarreia, cefaleia, ansiedade, agitação, acatisia, tremor e disfunção sexual são evidenciados. Alguns fármacos dessa classe são escitalopram, fluoxetina, paroxetina, fluvoxamina, sertralina, citalopram (BALDESSARINI, 2006).

Há evidências que os ISRS possuem efeitos anti-inflamatórios (KUBERA *et al.*, 2001; DURK *et al.*, 2005; ROQUE *et al.*, 2009; HORIKAWA *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Ohgi *et al.*, 2013, verificou que a fluoxetina e a paroxetina apresentaram efeitos antidepressivos no modelo de animal induzido por LPS, através da diminuição no tempo de imobilidade, pela diminuição de níveis de TNF- $\alpha$  e aumento de produção de IL-10, ocorrendo uma inibição da ativação microglial pró-inflamatória. Portanto, esses antidepressivos se ligam aos receptores de serotonina no cérebro, aumentando as concentrações extracelulares de serotonina. Desse modo, os ISRS inibem o transporte de serotonina enquanto elevam acentuadamente os níveis plasmáticos de serotonina (MERCADO & KILIC, 2010). Assim, sugere-se que a ativação serotoninérgica pode ser essencial para sua ação anti-inflamatória desses antidepressivos no tratamento da depressão.

O antidepressivo escitalopram (S-citalopram) é responsável essencialmente pela inibição da recaptação da serotonina (HYTTEL *et al.*, 1992), sendo o mais utilizado para o tratamento farmacológico de pacientes com depressão (BURKE *et al.*, 2002; WADE *et al.*, 2002; DONG *et al.*, 2016). Por conseguinte, os ISRS seriam antidepressivos adequados para utilização no tratamento farmacológico na depressão relacionada à inflamação (DONG *et al.*, 2016). Assim, os efeitos anti-inflamatórios e antidepressivos do escitalopram ocorrem através da ativação da

neurotransmissão serotoninérgica. A figura 8 mostra a estrutura química do escitalopram.

Figura 8: Estrutura Química do Escitalopram.



Fonte: <http://qnint.s bq.org.br>

Os antidepressivos ISRS têm sido amplamente utilizados em estudos. Os ensaios *in vitro* mostram que alguns antidepressivos também possuem propriedades anti-inflamatórias (DIAMOND *et al.*, 2006; HORIKAWA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011). Por exemplo, os ISRS, tais como paroxetina e sertralina, inibem a elevação do TNF- $\alpha$  e do óxido nítrico (NO), induzido pelo IFN- $\gamma$  em uma linha de células microgliais murinas (HORIKAWA *et al.*, 2010). Uma meta-análise mostra que o tratamento com ISRS diminui os níveis de TNF- $\alpha$  no soro humano (HANNESTAD *et al.*, 2011a) e alivia os sintomas depressivos (TUGLU *et al.*, 2003). Do mesmo modo, verificou-se que os antidepressivos fluoxetina, sertralina, paroxetina e fluvoxamina foram capazes de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  e NO em células da microglia, após exposição ao LPS (TYNAN *et al.*, 2012). Portanto, demonstrou-se que os antidepressivos podem alterar o potencial inflamatório da microglia, através de seus efeitos anti-inflamatórios.

Nesse contexto, foi verificado que os pacientes com transtorno depressivo maior possuem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em seu sangue

periférico (DOWLATI *et al.*, 2010) e a inflamação no córtex pré-frontal foi observada em pessoas com esse transtorno (SHELTON *et al.*, 2011). Os ISRS diminuem os níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes com transtorno depressivo maior e a diminuição está associada ao efeito terapêutico (HANNESTAD *et al.*, 2011a). Portanto, os ISRS podem melhorar os sintomas depressivos, inibindo a inflamação periférica e central através dos seus efeitos anti-inflamatórios (TUGLU *et al.*, 2003).

Em estudos envolvendo modelo de animais, foi verificado que a fluoxetina bloqueia o estresse social e o comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. Esses resultados sugerem que as propriedades anti-inflamatórias dos antidepressivos conferem um efeito sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pela inflamação (KASTER *et al.*, 2012). Evidências mostram que os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina bloqueiam os efeitos das citocinas pró-inflamatórias (HANNESTAD *et al.*, 2011).

Os ISRS, como fluoxetina e o S-citalopram, apresentam diferentes efeitos de modulação da ativação na microglia, os quais afetam a inibição da ativação da microglia M1 (pró-inflamatória), pela redução da expressão e liberação dos níveis citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6; pela inibição do NF- $\kappa$ B (LIU *et al.*, 2011), pelo bloqueio da função da proteína quinase A (PKA) (HASHIOKA *et al.*, 2007). Além disso, esses antidepressivos promovem a ativação da microglia M2, através do aumento de IL-4 e IL-13, desempenhando um papel anti-inflamatório (SU *et al.*, 2015). Portanto, os ISRS afetam o sistema imunológico no SNC, através dos seus efeitos neuroprotetores e moduladores, durante a inflamação.

Baseado em todas essas evidências, a elevação nos níveis de serotonina induzidas pelos ISRS, aumentam os processos de plasticidade neuronal, como aprendizagem, memória, neurogênese e excitabilidade neuronal, os quais estão envolvidos na modulação do processo inflamatório, através da regulação da microglia, da produção de citocinas, do eixo HPA, do estresse oxidativo e nitrosativo (YIRMIYA & GOSHEN, 2011; ALBONI *et al.*, 2016). Portanto, é provável que os efeitos moduladores dos antidepressivos possam contribuir para a sua eficácia terapêutica em pacientes com transtorno depressivo maior.

### 2.7.2 Doxíciclina e seu papel neuroprotetor

A doxíciclina está inserida na classe de antimicrobianos das tetraciclina de segunda geração, assim como a minociclina, as quais são agentes bacteriostáticos que se ligam à subunidade ribossomal 30S das bactérias, inibindo a síntese proteica e exibindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CUNHA *et al.*, 1982; ROBERTS, 2003). Além de sua eficácia no tratamento de infecções multirresistentes, esses antibióticos têm boa segurança clínica e podem penetrar facilmente na barreira hematoencefálica (DOMERCQ & MATUTE, 2004). No entanto, possuem vários efeitos terapêuticos, além de sua atividade antimicrobiana (AHLER *et al.*, 2013; BODE *et al.*, 2014).

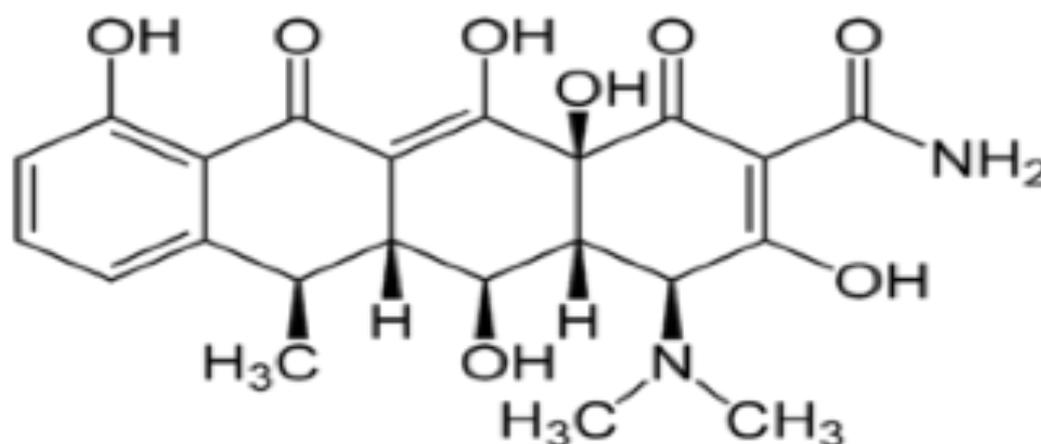
A respeito dessa tetraciclina de segunda geração, a mesma exerce uma variedade de ações biológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias e antiapoptóticas, bem como a inibição da proteólise, angiogênese e metástase tumoral (GARRIDO-MESA *et al.*, 2013). Como propriedades anti-inflamatórias, pode-se elucidar a inibição da ativação das células T e quimiotaxia, a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , a inibição da matriz das metaloproteinases (MMPs) (CUNHA, 2000) e ação anticolagenolítica, representada pela ação inibitória sobre a MMPs (TJADERHANE *et al.*, 2007).

Tanto a doxíciclina como a minociclina, apresentam atividades anti-inflamatórias (YI *et al.*, 2011) e imunomoduladoras (ANLAR *et al.*, 2007), modulando o sistema imunológico em várias condições inflamatórias. Baseado nisso, estudos anteriores relataram que a minociclina, pode inibir a ativação microglial, reduzindo os fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, após ativação da microglia por LPS (KIM *et al.*, 2004; HENRY *et al.*, 2008; FAN *et al.*, 2005; HORVATH *et al.*, 2008; ARAKAWA *et al.*, 2012). Verificou-se que essa droga tem múltiplos efeitos não microbianos que são benéficos em modelos experimentais de várias doenças com uma base inflamatória, tais como periodontite, aterosclerose, doenças autoimunes (por exemplo, artrite reumatóide) e doença inflamatória intestinal (GARRIDO-MESA *et al.*, 2013). Em outro estudo foi relatado que a doxíciclina induz menos eventos adversos que a minociclina (SMITH & LEYDEN, 2005).

Dentre as tetraciclinas, a doxiciclina, é um antimicrobiano de amplo espectro derivado da oxitetraciclina, uma tetraciclina semisintética, sua estrutura química segue na figura 9. Possui uma maior solubilidade em lipídios, atravessando a barreira hematoencefálica. A doxiciclina não é metabolizada no fígado, a maior parte do fármaco é excretada nas fezes e minimamente eliminada por via renal. Em pacientes com a função renal normal, a excreção da droga ativa é 20-26% na urina e 20-40% nas fezes em 48 horas após o tratamento. O tempo de meia-vida varia de 14 a 24 horas, dependendo de dose única ou repetida, e aumentada até 17-30 horas em pacientes com insuficiência renal (ROMANOWSKI *et al.*, 1993). É altamente estável no soro humano normal, não se degradando para uma forma epianidro (MCCULLOCH & BIREK, 1990).

A doxiciclina é a tetraciclina mais utilizada na medicina humana e está incluída na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017). Dentre as tetraciclinas disponíveis, a doxiciclina é a que possui um histórico maior de segurança comparado com as drogas da mesma classe, devido possuir uma menor afinidade pelo cálcio, permitir uma administração uma ou duas vezes por dia, pelo seu tempo de semivida, um baixo custo econômico (PEREZ-TRALLERO & IGLESIAS, 2003), sendo rapidamente absorvida e possuindo um elevado índice de penetração na região cerebral (YIM *et al.*, 1985), pré-requisito para uma droga agir no SNC (ANDERSON & ALESTIG, 1976; ZHANG *et al.*, 2009).

Figura 9: Estrutura Química da Doxiciclina.



O mecanismo anti-inflamatório da doxiciclina pode envolver a inibição de mediadores do processo inflamatório, tais como interleucinas e prostaglandinas, a inibição da atividade de iNOS e atividade antioxidante (RIAZI *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a inflamação periférica aumenta a ativação da microglia por fatores inflamatórios e a inibição desta ativação é vista como um dos mecanismos da doxiciclina (SWEITZER *et al.*, 1999). Portanto, estratégias farmacológicas que visam a supressão da atividade microglial estão sendo exploradas como novas terapias de tratamento (MELLO *et al.*, 2013; SANTA-CECILLIA *et al.*, 2016).

Outra via anti-inflamatória da doxiciclina é através da inibição da síntese de óxido nítrico. Diante do exposto, um estudo realizado por Millano *et al.*, 1997, verificou que as tetraciclinas, incluindo a doxiciclina, possuem a capacidade de inibir citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS. Os dados sugerem que a inibição direta da liberação de nitrito é o principal mecanismo da atividade anti-inflamatória de doxiciclina no choque séptico (D'AGOSTINO *et al.*, 1998).

Estudos realizados anteriormente indicam o uso da doxiciclina na regulação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, sugerindo a sua utilidade para o tratamento da inflamação induzida por exposição de agentes bacterianos (KRAKAUER & BUCKLEY, 2003; BODE *et al.*, 2014; SANTA-CECILIA *et al.*, 2016). Em um estudo utilizando a doxiciclina, no pré e pós-tratamento, foi demonstrado que esta tetraciclina foi capaz de prevenir e reverter as alterações comportamentais induzidas por LPS, em um modelo animal de comportamento tipo-depressivo. O efeito anti-inflamatório da doxiciclina foi acompanhado pela restauração de alterações induzidas por LPS em mediadores inflamatórios cerebrais e pelo teor de nitrito nos parâmetros de estresse oxidativo (MELLO *et al.*, 2013).

As propriedades neuroprotetoras também são evidenciadas nos efeitos das tetraciclinas, pois a neuroinflamação é um fator importante tanto na patogênese quanto na progressão de doenças neurodegenerativas (ZHANG *et al.*, 2013). Há fortes evidências que relataram as ações neuroprotetoras das tetraciclinas, em modelos de isquemia cerebral, lesão medular, Mal de Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (PENNINX *et al.*, 2003; GORDON *et al.*, 2004; THOMAS *et al.*, 2004; DOMERCQ & MATUTE, 2004; EVANS *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2012; METZ *et al.*, 2013).

A esse respeito, a doxiciclina possui uma atividade neuroprotetora mediada pela inibição da ativação microglial, devido os fatores inflamatórios serem liberados pela microglia ativada. Nesse sentido, um estudo recente verificou que a doxiciclina limitou a produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , através da inibição da sinalização de p38 MAPK e NF- $\kappa$ B, em células microgliais estimuladas por LPS. A partir disso, pode ser um dos possíveis mecanismos moleculares que contribuem para o efeito da doxiciclina (SANTA-CECILIA *et al.*, 2016).

A doxiciclina tem sido testada quanto a seus efeitos neuroprotetores em modelos de Mal de Parkinson, através da regeneração dos neurônios nigrais induzida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) (KIM *et al.*, 2007). Além disso, essa droga tem sido utilizada para o tratamento de infecções no SNC, nos modelos de lesão cerebral (CLARK *et al.*, 1997; REASONER *et al.*, 1997; YRJANHEIKKI *et al.*, 1998; GORDON *et al.*, 2004) e doenças de acidente vascular cerebral (LAI & TODD, 2006), no modelo animal de isquemia cerebral focal e global (CLARK *et al.*, 1994; TIKKA & KOISTINAHO, 2001). Por outro lado, foi relatada a regulação das MMPs, através do tratamento com doxiciclina. Essa droga pode suprimir a indução de MMP-3 e, assim, proporcionar uma ação neuroprotetora por meio de dois mecanismos anti-apoptóticos e anti-inflamatórios (WEBSTER & TOSO, 1994; SOLOMON *et al.*, 2000).

Baseado nessas evidências, a inflamação tem um papel importante na etiologia do humor depressivo, pelo envolvimento dos processos neuroinflamatórios, neuroendócrinos e neuroplásticos, dependentes do sexo, através de um desafio imune desencadeado por LPS. E um novo tratamento é proposto para reverter comportamentos tipo-depressivos em modelos de animais desencadeados por LPS.

### **3 HIPÓTESES**

1. Animais machos e fêmeas possuem respostas diferentes quando submetidos a exposição única ao LPS, devido o dimorfismo sexual.
2. Antimicrobianos apresentam efeitos terapêuticos contra comportamentos tipo-depressivos, baseado no fato de que fármacos como a minociclina e ceftriaxona apresentam efeitos neuroprotetores, sendo pesquisados como adjuvantes no tratamento de transtornos mentais.
3. A associação de antimicrobianos e antidepressivos pode contribuir para a redução da dose do antidepressivo e abreviar o tempo para a manifestação de sua ação terapêutica.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Investigar a influência do sexo nas alterações comportamentais e neuroinflamatórias/oxidativas no modelo de animal de depressão por desafio imune por administração sistêmica única de LPS. Avaliar em animais machos submetidos a administração repetida de LPS, os efeitos terapêuticos da associação entre escitalopram e doxiciclina, com o intuito de contribuir para um maior conhecimento da fisiopatologia e tratamento da depressão relacionada à translocação bacteriana.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a influência do sexo em alterações comportamentais e neuroquímicas de camundongos submetidos a administração única de LPS, através de:

- Comportamentos relacionados a depressão (teste de nado forçado), anedonia (teste de preferência por sacarose), atividade locomotora (teste do campo aberto) e ansiedade (teste do labirinto em cruz elevado);
- Alterações oxidativas através da determinação de GSH e peroxidação lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo;
- Alterações inflamatórias através da atividade da Mieloperoxidase (MPO) e IL-1 $\beta$  nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo;
- Níveis de BDNF no hipocampo e hipotálamo.

- Avaliar em animais submetidos a administração repetida de LPS e tratados com escitalopram ou doxiciclina sozinhos ou em associação, as seguintes alterações:

- Comportamentais relacionadas a depressão (teste de nado forçado, alimentação suprimida pela novidade), anedonia (teste de preferência por sacarose) e atividade exploratória (teste do campo aberto);
- Oxidativas através da determinação de glutathiona reduzida (GSH), peroxidação lipídica (TBARS) e nitrito em córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo;
- Em sinalizações pró-inflamatórias no hipocampo, como níveis de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , IBA-1 e do fator transcripcional NF- $\kappa$ B;
- Em sinalizações protetoras no hipocampo, pelos níveis de fosforilação das quinases ERK 1/2, GSK-3 $\beta$  e do fator transcripcional CREB.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Os animais utilizados foram Camundongos *Swiss* adultos (25 - 30g) machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram alojados em gaiolas de polipropileno (42 x 20.5 x 20 cm), com ração e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos a temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas e ambientados em grupos de 8 por gaiola. O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC através do protocolo nº 120/14 e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América.

### 5.2 Drogas

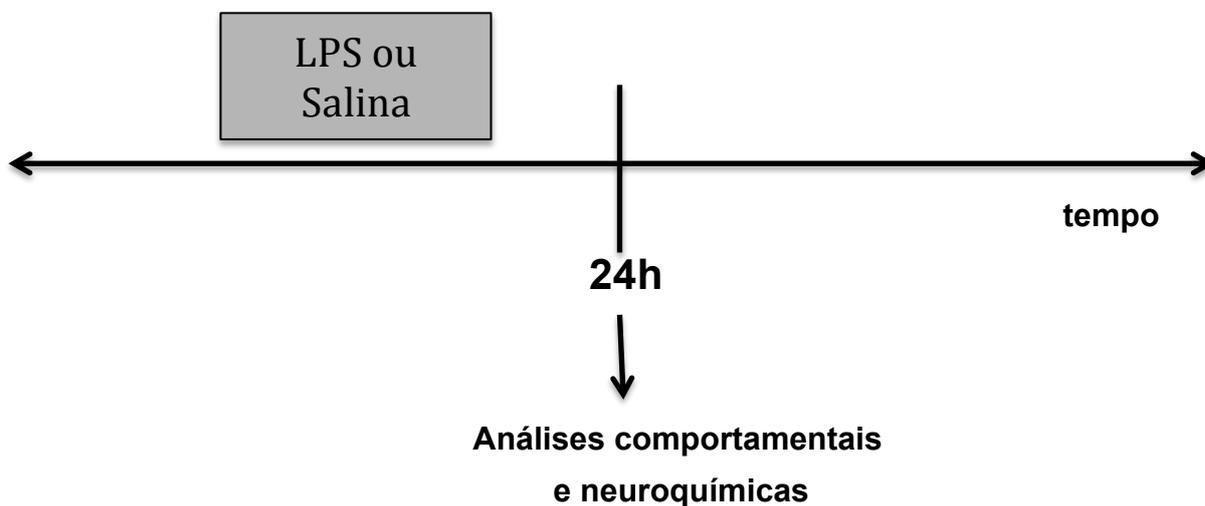
Os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, EUA, LPS 0,5 mg/Kg) dissolvido em solução salina estéril. O antimicrobiano Doxiciclina (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, EUA, DOXI 10 mg/Kg, i.p.) foi dissolvido em solução de salina estéril. O antidepressivo Escitalopram (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, EUA, ESCI 4 mg/Kg, i.p.) diluído em em solução de salina estéril. O grupo controle recebeu solução salina estéril. Todas as soluções foram administradas em um volume de 0,1ml a cada 10g de peso corporal.

### 5.3 Procedimento Experimental

#### Protocolo 1 – Influência do sexo nas alterações comportamentais e neuroquímicas observadas 24 h após administração única de LPS

Para este protocolo os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de dez animais, machos ou fêmeas, os quais foram administrados intraperitonealmente (i.p.) com LPS (0,5 mg/Kg) ou solução salina e após 24h foram realizados os testes comportamentais e neuroquímicos (Figura 10). A escolha do período de 24h para observação após administração do LPS foi baseado na ocorrência de comportamento tipo-depressivo (DANTZER *et al.*, 2008, PARK *et al.*, 2011, OHGI *et al.*, 2013; CUSTODIO *et al.*, 2013; TOMAZ *et al.*, 2014).

Figura 10 – Demonstração esquemática para o protocolo de administração única de LPS.

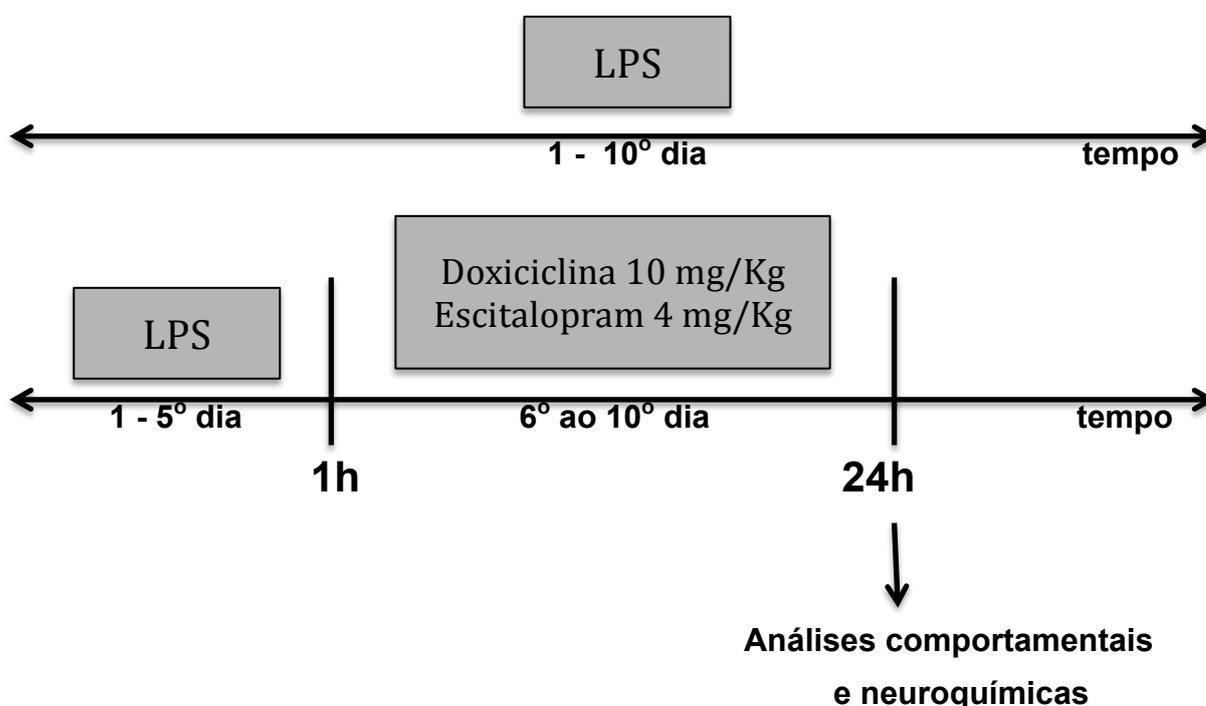


Fonte: elaborada pela autora.

## Protocolo 2 – Estudo de alterações moleculares pela administração repetida de LPS a camundongos machos e efeito do tratamento com escitalopram e doxiciclina sozinhos ou em associação

Para o protocolo 2, apenas animais machos receberam LPS (0,5 mg/Kg i.p), durante 10 dias, seguido de tratamento com doxiciclina (10 mg/kg i.p), escitalopram (4 mg/Kg i.p) ou solução salina, do 6° ao 10° dia, 1h após a administração de LPS, conforme figura 11. Grupos distintos receberam doxiciclina ou escitalopram sozinhos e outros receberam essas duas drogas concomitantemente. A dose de doxiciclina utilizada foi escolhida com base em estudo anterior (MELLO *et al.*, 2013). Nesse estudo foi observado efeito antidepressivo da doxiciclina nas doses de 25 e 50 mg/kg. No presente estudo baixamos a dose de doxiciclina para 10 mg/kg com o intuito de usar uma dose abaixo da dose antimicrobiana deste fármaco, calculado de acordo com a área da superfície corporal (Reagan-Shaw *et al.*, 2008).

Figura 11 – Modelo Experimental de Protocolo de Tratamento.



Os animais utilizados para determinações neuroquímicas foram eutanasiados por deslocamento cervical. As áreas cerebrais dissecadas foram: o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e hipotálamo (HT). Todo o material biológico foi imediatamente armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o ensaio.

## **5.4 Testes comportamentais**

### **5.4.1 Teste do Nado Forçado**

O teste do nado forçado, foi descrito primeiramente por Porsolt, 1978. Os animais foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico (25 cm de altura, 10 cm de diâmetro) contendo 8 cm de água mantida a  $22-24^{\circ}\text{C}$ . Após 1 minuto de habituação, o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais foi avaliado durante 5 minutos, em um tempo total de 6 minutos no interior do cilindro. A imobilidade é definida como a ausência de ação, fuga orientada e comportamentos foram analisados como: natação, salto, cheiro ou mergulho (PORSOLT *et al.*, 1978).

### **5.4.2 Teste do Campo Aberto**

O teste do campo aberto foi realizado com a finalidade de analisar a atividade locomotora e exploratória dos animais, bem como identificar comportamentos de ansiedade ou tipo-depressivos (PRUT & BELZUNG, 2003). A arena para o teste é feita de acrílico (30 x 30 x 15 cm) rodeado por paredes de 5 cm de altura feitas de acrílico, com o chão preto do campo aberto foi dividido em nove quadrantes por linhas brancas. O aparelho foi colocado em uma sala com luz vermelha. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro do campo e foi permitido que explorassem livremente o cenário por 1 min (período de habituação). A atividade exploratória do animal foi registada durante 5 min (ARCHER, 1973) e foi obtido o mapa da trajetória percorrida por cada animal na arena.

Com o apoio do software *SMART* vídeo tracking foram avaliados

automaticamente os seguintes parâmetros: atividade global total ( $\text{cm}^2/\text{min}$ ), distância total (cm), transições de zona (n); atividade na zona central (%), tempo na zona central (%), tempo na zona central (s), tempo de exploração do objeto novo (%), tempo de exploração do objeto novo (s). Além disso, o número de levantamentos verticais ou *rearings* (número de vezes que o animal ergueu-se nas patas traseiras ou atividade locomotora vertical) e o número de *groomings* (comportamento estereotipado) foram contados por meio da observação comportamental. 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 vídeo tracking versão 3.0.03 da Panlab Harvard Apparatus®.

#### **5.4.3 Labirinto em cruz elevado (*Plus maze*)**

O labirinto em cruz elevado originalmente descrito por Pellow, 1985 foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos “padrão exploratório” sobre o comportamento de risco e ansiedade dos animais. O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) com uma plataforma central comum (5 x 5 cm). Todo o aparelho foi levantado 45 cm acima da sua base, e o teste foi feito sob luz vermelha fraca (2 x 60W). O animal é colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados no início do experimento. O tempo de permanência do animal em cada braço e o número de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados durante 5 minutos. O experimento foi realizado numa sala de comportamento isolada de ruídos e com baixa iluminação.

#### **5.4.4 Preferência por sacarose**

O teste de preferência pela sacarose foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos de anedonia nos animais, como comportamento tipo-depressivo. Antes da realização do teste, os animais são habituados a solução de sacarose 1% (p/v). Inicialmente, 72h antes do teste, foram colocadas 2 garrafas de sacarose 1% em

cada gaiola. 24h mais tarde foi substituída uma garrafa de sacarose por água, permanecendo por mais 24h. Após habituação, os animais foram privados de água e comida durante 24h. O teste de preferência de sacarose foi conduzido às 9:00 horas da manhã. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e tiveram acesso a duas garrafas contendo 100 ml de solução de sacarose 1% (w/v) e 100 ml de água, respectivamente. Após 1h, os volumes de solução de sacarose e água consumidos registados e a preferência de sacarose foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Preferência por sacarose} = \frac{\text{consumo de sacarose}}{\text{consumo de água} + \text{consumo de sacarose}} \times 100\%.$$

#### **5.4.5 Teste da alimentação suprimida pela novidade (*Novel Supressed Feeding Test*)**

O teste da alimentação suprimida pela novidade foi realizado como descrito anteriormente (WARNER-SCHMIDT & DUMAN, 2007). Antes do teste, os animais foram privados de alimentos durante à noite. No dia do teste, os animais foram colocados em uma arena de acrílico (30 x 30 x 15 cm) rodeado por paredes de 5 cm de altura, com uma pequena quantidade de alimento no centro. O teste tem duração de 8 min. Nesse período, os animais exploraram toda a arena. Foi registrado a latência de cada animal para alimentar-se, ou seja, o tempo que o animal levou para dar a primeira mordida no alimento. O tempo de ingestão do alimento também foi medido.

### **5.5 Testes Neuroquímicos**

Após administração i.p. de LPS, salina, doxiciclina e escitalopram os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e as áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipotálamo e hipocampo) foram retiradas e imediatamente acondicionadas em temperatura a -70°C para realização das análises neuroquímicas.

## **5.5.1 Determinação das alterações oxidativas**

### **5.5.1.1 Determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de DRAPER & HADLEY (1990), seguindo o protocolo: foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%, 0,25 µL do homogeneizado será misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 minutos, adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 minutos). Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e foi expressa como mmol tecido malonaldeído (MDA)/mg de proteína (OHKAWA *et al.*, 1979).

### **5.5.1.2 Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)**

Os níveis de glutathiona reduzida foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em EDTA 0,02M, retirados 400µL desse homogenato e adicionados a 320µL de água destilada e mais 80µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, recolhido 400µL do sobrenadante e acrescidos 800µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20µL de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm através de espectrofotômetro. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão (SEDLAK & HANUS, 1982).

### 5.5.1.3 Determinação do conteúdo de Nitrito

Os homogenatos das áreas cerebrais foram preparados a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes são coletados e o conteúdo de nitrito foi determinado através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi incubada com 100 µl do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%/diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito (µM) foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>).

## 5.6 Determinação de parâmetros relacionados a sinalizações pró-inflamatórias e protetoras

### 5.6.1 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração de neutrófilos dos tecidos. Neste ensaio, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é clivada por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio (O<sub>2</sub>) resultante se combina com diidrocloreto de  $\theta$ -dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio (BRADLEY, 1982).

Imediatamente após a decapitação, as áreas cerebrais foram homogeneizadas (50 mg/ml) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Foram retirados 30µL do sobrenadante da amostra e adicionados a placa de ELISA juntamente com 200µL da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de  $\theta$ -dianisidina e 0,0005% de

peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0 e 3 minutos com comprimento de onda de 460nm (BRADLEY, 1982).

### **5.6.2 Teste de ELISA para dosagem dos níveis de IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ e BDNF**

A detecção das citocinas e BDNF foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). As áreas cerebrais dissecadas (córtex pré-frontal, hipotálamo e hipocampo) foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS com inibidores de protease (EMD Biosciences) e fosfatase (Sigma-Aldrich) e centrifugadas (10000 rpm, 5 min). Nas placas para ELISA, contendo 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por 18h em temperatura ambiente com 100 $\mu$ L de anticorpo em 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 1h. Após o bloqueio, 100 $\mu$ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2h 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 para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em temperatura ambiente por 2h. 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. Novamente, 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 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/g tecido.

## **5.7 Expressão protéica de ERK 1/2, IBA-1, GSK-3 $\beta$ , NF- $\kappa$ B e p-CREB por *Western Blotting***

Para avaliar a expressão protéica hipocampal desses alvos moleculares realizou-se *Western Blotting*. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e *Western Blotting*.

### **5.7.1 Preparação do Extrato Total de Proteínas**

Os tecidos hipocampais foram homogeneizados manualmente em 2 mL de tampão de lise RIPA 01X (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 (Sigma Aldrich, EUA, 1 $\mu$ L de inibidor de protease: 100 $\mu$ L de RIPA) usando um pistão de vidro (Potter). Os homogenatos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos, sendo os sobrenadantes, contendo o extrato de proteínas de todos os compartimentos celulares, coletados. Os pellets residuais foram descartados. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford descrito a seguir. Todos os procedimentos foram realizados com as amostras imersas em gelo, e em condições de boa refrigeração e condicionamento.

### **5.7.2 Método 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 absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160  $\mu$ L de amostra e 40  $\mu$ L 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.

### 5.7.3 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), vortexando por 10 s, aquecendo no 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 60V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120V para o restante da corrida, onde foi utilizado o 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 100V 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 minutos cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primário mouse rabbit phospho-GSK3 beta (Ser9) monoclonal IgG (1:1000, Invitrogen, USA), phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000, Cell Signaling Technology, USA), mouse Anti-ERK1 + ERK2 monoclonal IgG (1:2000, Abcam, Brasil), mouse rabbit anti-Iba 1 (0.5 µg/mL, Wako, USA), mouse Anti-α-tubulin IgG (1:4000; Sigma, USA), mouse rabbit policlonal Anti-GSK3 (alpha + beta) IgG (1:100, Abcam, Brasil), mouse rabbit polyclonal anti-NFκB IgG (100 µg/ml, Santa Cruz, Brasil) e mouse rabbit phospho-CREB (1:1000, Abcam, Brasil), 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 anti-rabbit IgG (1:200, Wako, USA) e HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) (1:2000; Invitrogen, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 minutos 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 minutos. 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).

## 5.8 Análise estatística dos resultados

A análise dos dados foi realizada através do *software* GraphPad Prism, versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. Os resultados comportamentais, parâmetros do estresse oxidativo, BDNF e análise de mieloperoxidase foram analisados por ANOVA de duas vias considerando como fatores 'sexo' e 'desafio imune por LPS' seguido pelo teste de Tukey, como teste *post hoc* para comparações múltiplas e expressas como média  $\pm$  EPM.

Os resultados do protocolo 1 foram analisados por ANOVA de duas vias (regular) seguida por teste de Tukey *post hoc*. Os resultados dos experimentos para análise de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram analisados através de *Fourth-party Logistics* (4PL). Os resultados comportamentais do protocolo de tratamento foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey como teste *post hoc* para comparações múltiplas. Os dados obtidos por *Western Blotting* foram analisados através de ANOVA de uma via seguida por teste de Tukey. Valores significativos para as análises foram considerados quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### Protocolo 1

#### 6.1 Influência do sexo sobre o tempo de imobilidade no nado forçado em camundongos expostos ao LPS

O teste de nado forçado é um teste padrão ouro utilizado para a avaliação de comportamento de depressão-símile em roedores. Neste teste a ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre os fatores 'sexo' e 'desafio imune por LPS' [ $F(1, 27) = 4,989, P = 0,0340$ ]. Verificou-se que houve aumento significativo de imobilidade do grupo dos machos tratados com LPS comparado com o grupo salina. Em relação ao grupo das fêmeas tratadas com LPS não foi verificada significância em relação ao seu controle. Também, foi verificado que o grupo dos machos tratados com salina e LPS teve o tempo de imobilidade mais elevado, significativamente, comparado com o grupo de fêmeas tratadas com o mesmo veículo (Figura 12).

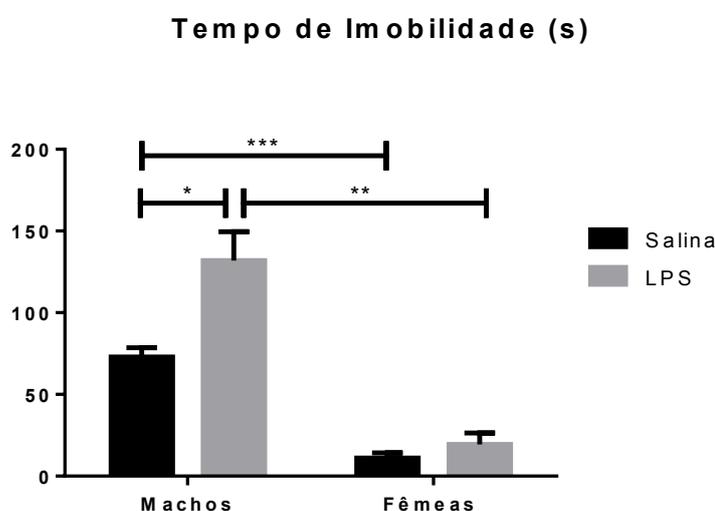


Figura 12 - Tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em animais machos e fêmeas (n=10 animais/grupo) tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg, i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05, \*\*P <0,01, \*\*\*P < 0,001.

## 6.2 Influência do sexo sobre a preferência por sacarose em camundongos expostos ao LPS

No teste de Preferência por Sacarose não houve interação significativa entre os fatores 'sexo' e 'desafio com LPS', mas houve efeito principal do fator 'desafio imune por LPS' [ $F(1, 25) = 29,05, P < 0,0001$ ]. Neste teste foi verificada uma diminuição significativa pela preferência por sacarose, em ambos os sexos, tratados com LPS comparados com o mesmo grupo tratado com salina (Figura 13).

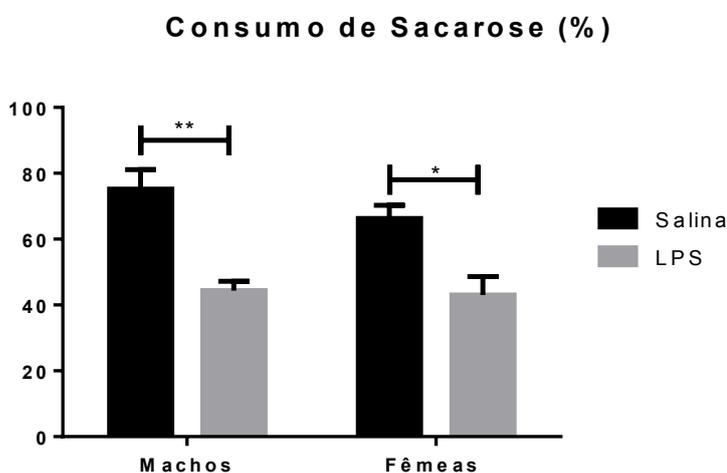


Figura 13 - Teste de preferência de sacarose em animais machos e fêmeas (n=10 animais/grupo) tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg, i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05, \*\*P <0,01.

### **6.3 Influência do sexo sobre a atividade locomotora no Campo Aberto em camundongos expostos ao LPS**

As análises de dados do Campo Aberto mostraram que no tratamento com LPS, a atividade locomotora manteve-se inalterada, os cruzamentos (*crossings*) e levantamentos verticais (*rearings*) em ambos os sexos em relação aos respectivos grupos de salina. O número de *grooming* (*comportamento estereotipado*) foi aumentado significativamente no grupo das fêmeas comparado com o grupo salina. Em relação ao grupo de machos não houve significância. O tempo no meio do campo em ambos os sexos também não foi verificada alteração significativa (Figura 14).

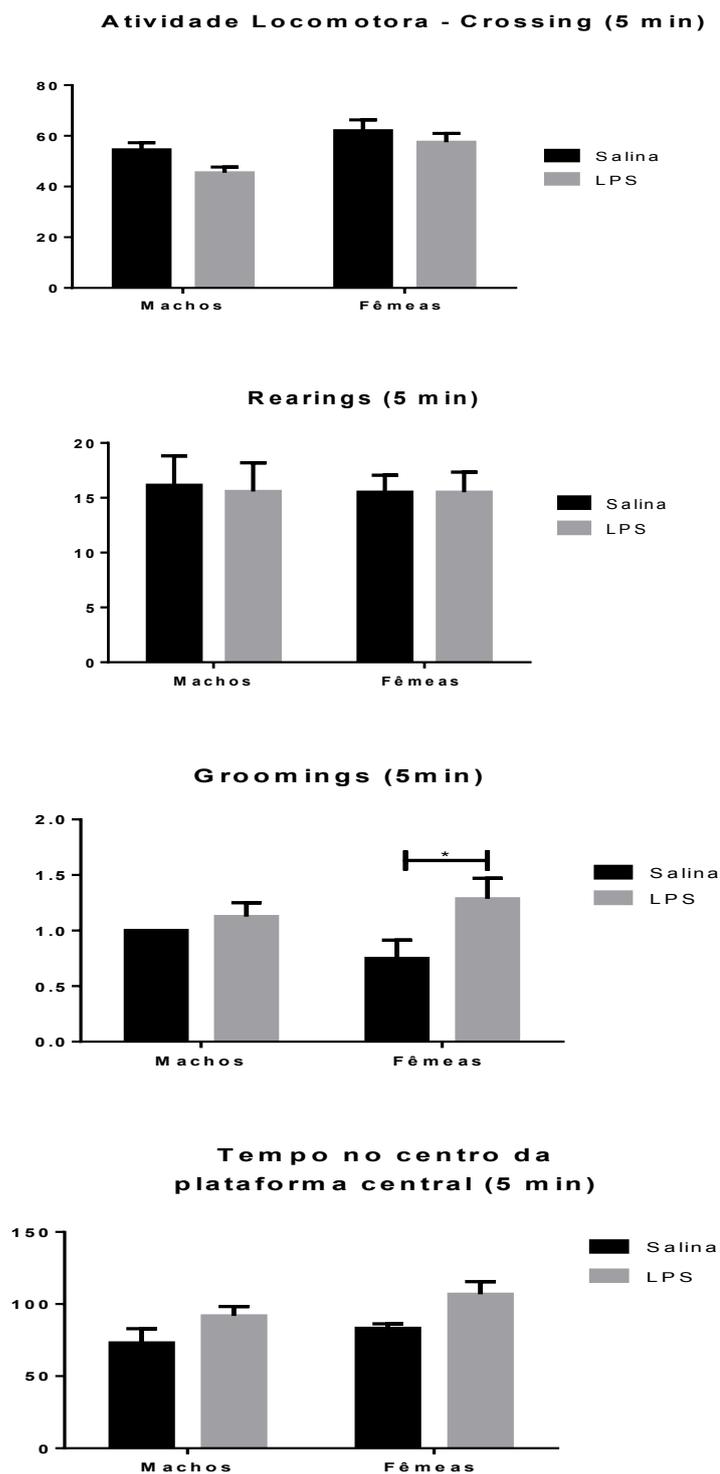


Figura 14 – Teste no Campo Aberto sobre atividade locomotora de animais machos e fêmeas (n = 10 animais/grupo) tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05 vs respectivo controle.

#### **6.4 Influência do sexo sobre o comportamento de ansiedade no Labirinto em Cruz elevado em camundongos expostos ao LPS**

As fêmeas apresentaram comportamento de ansiedade, devido uma diminuição significativa no número de entradas nos braços abertos em comparação com o grupo controle, (EPM - Controle:  $8,5 \pm 0,9$ ; LPS:  $5,2 \pm 0,4$ ). Em relação ao grupo dos machos não foi verificada significância. O tempo no braço aberto e na plataforma central, também não foi verificada nenhuma alteração significativa, conforme figura 15.

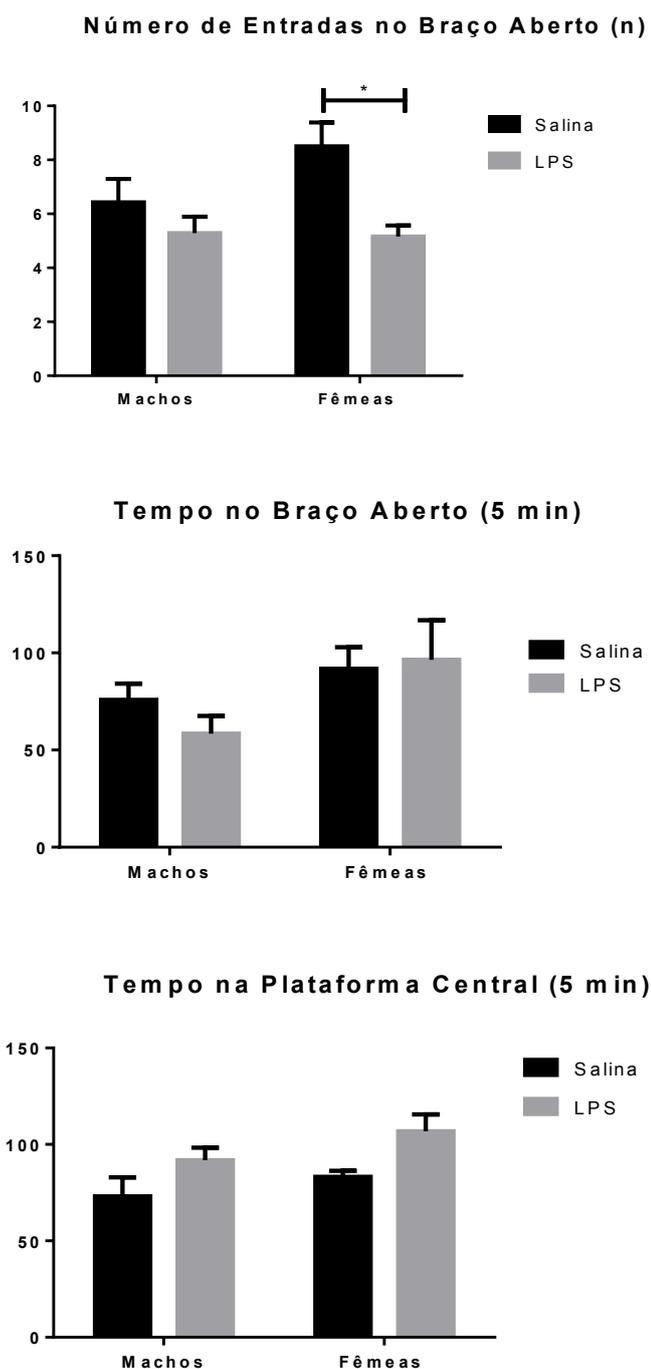


Figura 15 – Teste no *Plus Maze* sobre o comportamento de ansiedade de animais machos e fêmeas (n= 10 animais/grupo) tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg, i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05, \*\*P <0,01.

## **6.5 Influência do sexo sobre a peroxidação lipídica de áreas cerebrais de camundongos expostos ao LPS**

As alterações oxidativas do estresse oxidativo foram avaliadas através da peroxidação lipídica pelo método da determinação dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressas por malonaldeído (MDA), nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo, em ambos os sexos. Foi verificado um aumento significativo nos níveis de MDA na área do hipocampo dos machos e na área hipotalâmica das fêmeas.

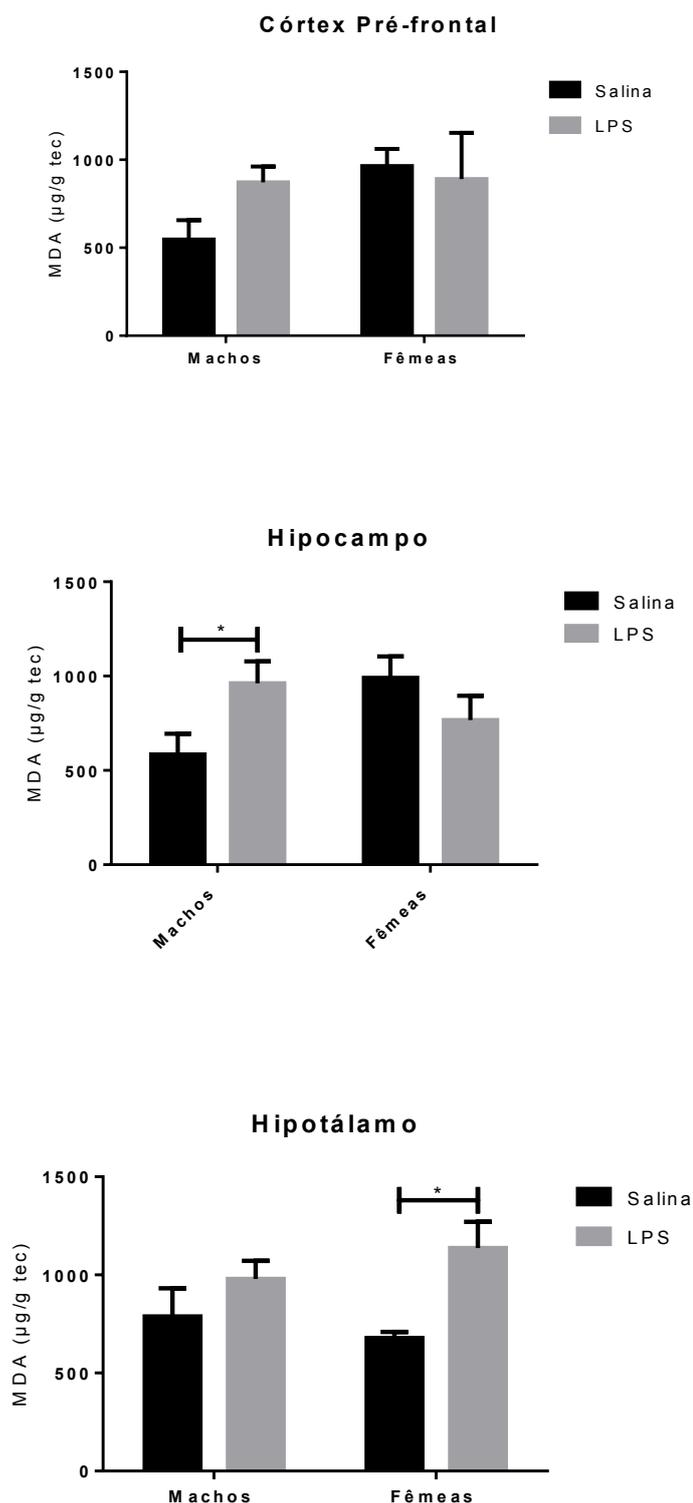


Figura 16 - Níveis de MDA em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \* $P < 0,05$ .

## **6.6 Influência do sexo sobre os níveis cerebrais de GSH em camundongos expostos ao LPS**

A Figura 17 demonstra que em todas as áreas do cérebro, em ambos os sexos, 24h após a administração única de LPS, houve uma diminuição significativa no conteúdo de GSH, quando comparado com o grupo salina. No córtex pré-frontal foi verificado que os níveis basais de GSH são mais elevados nas fêmeas que nos machos, em relação aos respectivos grupos controles.

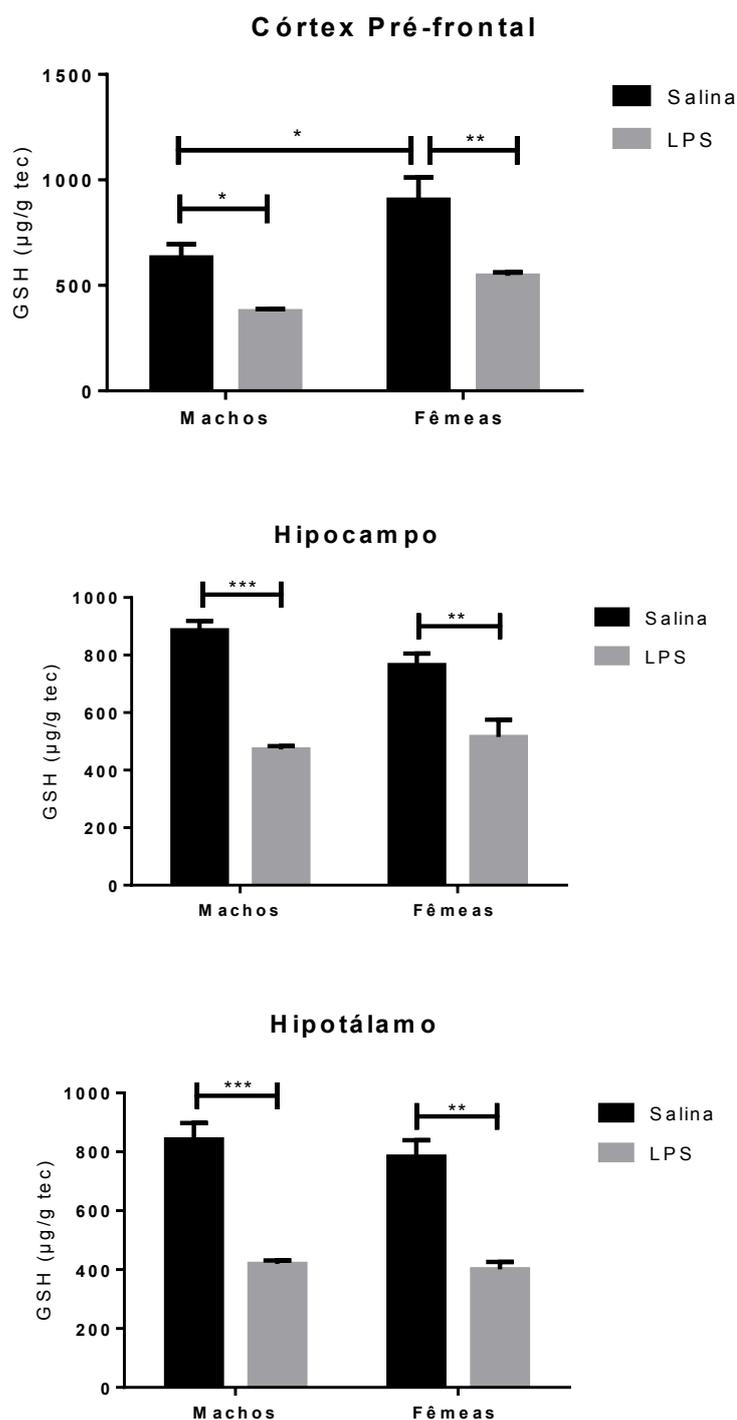


Figura 17 – Níveis de GSH em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

### **6.7 Influência do sexo sobre a atividade da mieloperoxidase em áreas cerebrais de camundongos expostos ao LPS**

Foi verificado o aumento da atividade da MPO na área do córtex pré-frontal, em ambos os sexos, desafiados com LPS quando comparados aos grupos salina (controle macho:  $1,6 \pm 0,2$ , LPS:  $2,7 \pm 0,2$ ; controle fêmea:  $0,7 \pm 0,1$ , LPS:  $1,9 \pm 0,1$ ), enquanto no hipocampo ocorreu aumento da atividade da MPO, apenas nas fêmeas. Também, foi verificado que os machos possuem uma atividade da MPO basal mais elevada que as fêmeas, em relação ao grupo salina. Na área do hipotálamo não foi verificado nenhuma alteração significativa, conforme figura 18.

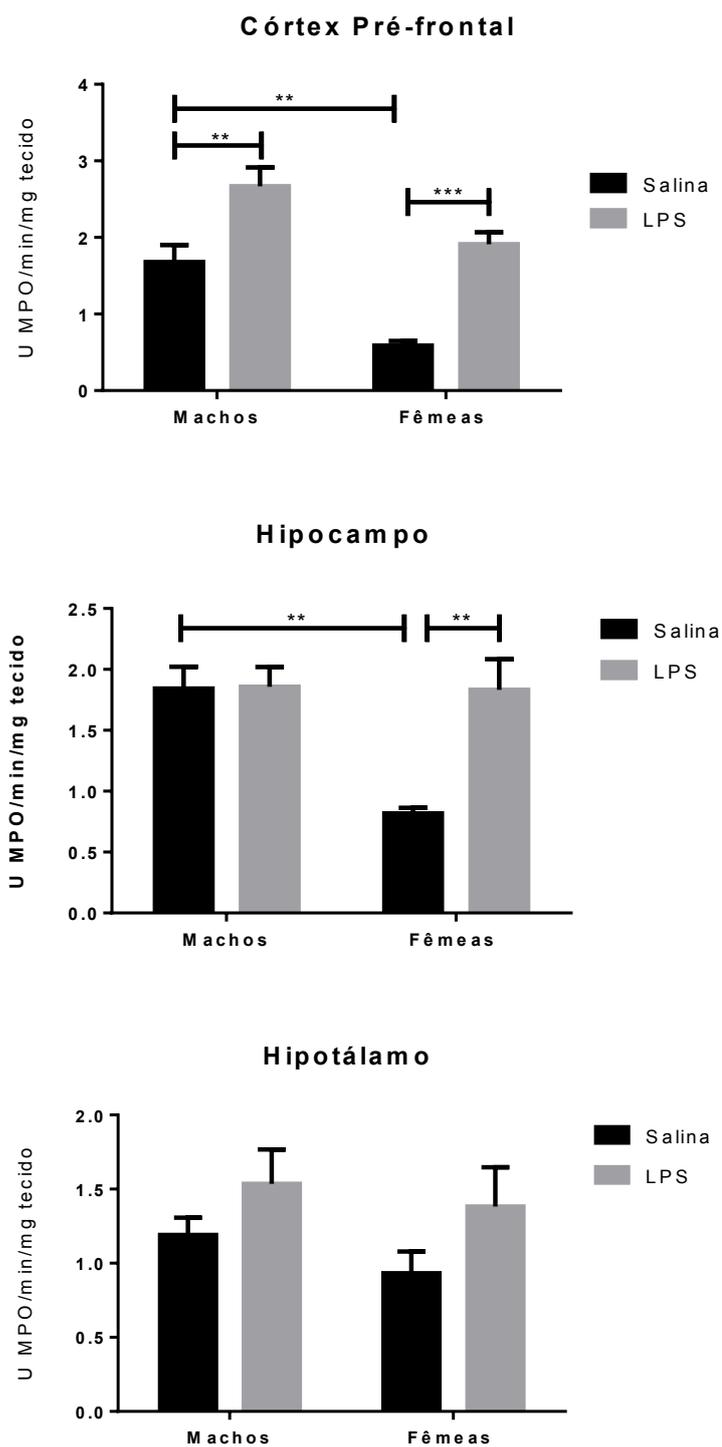


Figura 18 - Atividade inflamatória na Mieloperoxidase (MPO) de animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

## **6.8 Influência do sexo sobre os níveis cerebrais de IL1 $\beta$ em camundongos expostos ao LPS**

A administração de LPS promoveu um aumento significativo nos níveis de IL-1 $\beta$  quando comparado com o grupo salina nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal e hipotálamo, em ambos os sexos. No hipocampo dos animais machos desafiados ou não com LPS ocorreu aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$ , conforme figura 19.

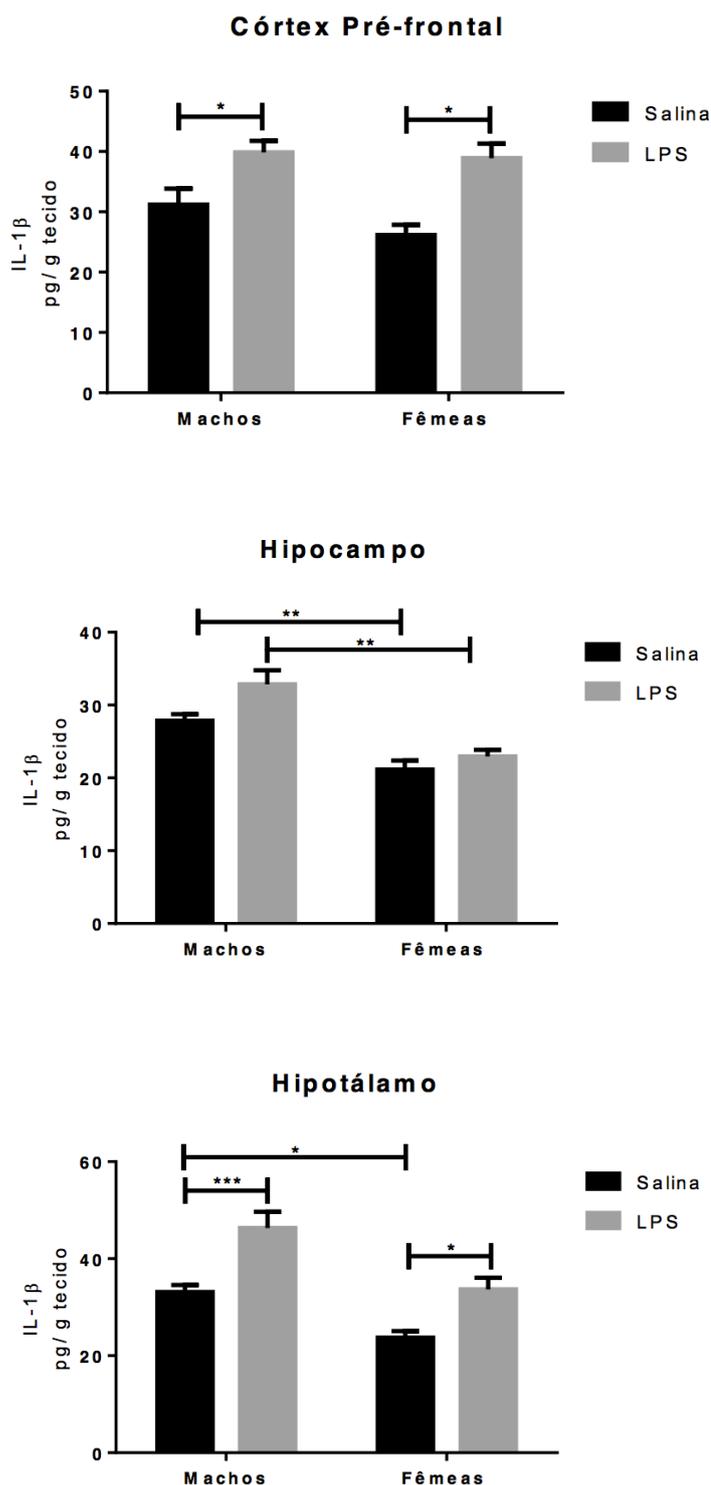


Figura 19 – Níveis de IL-1 $\beta$  em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

## 6.9 Influência do sexo sobre os níveis hipocâmpais de BDNF em camundongos expostos ao LPS

As análises dos níveis de BDNF, 24h após a administração de LPS, não apresentaram alterações significativas em relação aos grupos salina, em ambos os sexos, nas áreas hipocâmpais e hipotalâmicas (Figura 20). No hipotálamo foi verificado um aumento significativo nos níveis de BDNF no grupo fêmeas tratadas com LPS comparado com o grupo machos, tratados com o mesmo veículo.

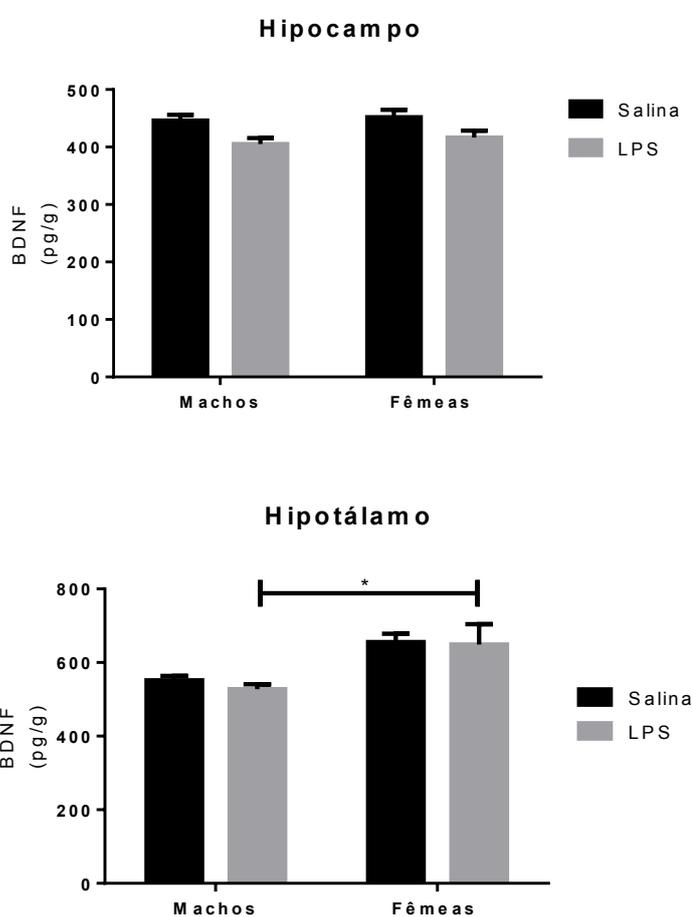


Figura 20 - Níveis de BDNF em animais machos e fêmeas tratados com administração única de LPS 0,5 mg/kg i.p. e observados 24 h após administração. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

## Resultados Protocolo 2

### 6.10 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre o comportamento tipo-depressivo induzido por administração repetida de LPS

A administração repetida de LPS (0,5 mg/kg, i.p) aumentou significativamente o tempo de imobilidade no nado forçado quando comparado com os animais do grupo salina (SAL), ao passo que a doxiciclina (DOXY) ou escitalopram (ESCI) sozinhos ou em associação reverteram a imobilidade induzida por LPS. A doxiciclina, similarmente ao escitalopram, quando administrados pós-LPS, diminuíram significativamente o tempo de imobilidade quando comparado com os grupos LPS, indicando deste modo um efeito tipo antidepressivo da doxiciclina. As duas drogas administradas concomitantemente, diminuíram ainda mais esse tempo de imobilidade sendo significativo em relação ao grupo tratado com doxiciclina+LPS e escitalopram+LPS, conforme figura 21.

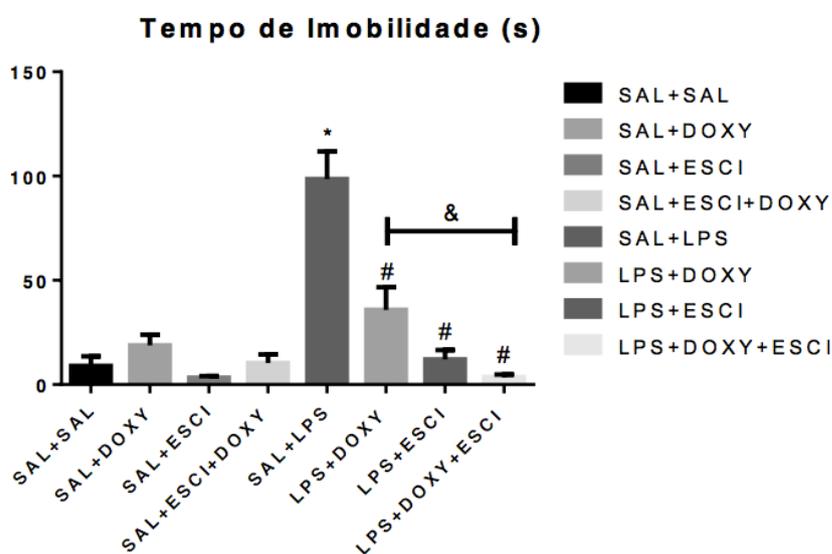


Figura 21 - Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em animais machos (n=10 animais/grupo) tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média ± EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via seguida por Tukey *post test*. \*,#P <0,05 vs controle e LPS, respectivamente. &P < 0,05.

### **6.11 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a atividade locomotora**

Os resultados mostraram que 24h após a administração de LPS, a atividade locomotora permaneceu inalterada quando comparado ao grupo salina (SAL). O pós-tratamento com doxiciclina e escitalopram sozinhos e concomitantemente aumentaram a atividade locomotora global e o tempo de exploração do objeto novo quando comparados ao grupo do LPS. Após administração de doxiciclina verificou um aumento na atividade na zona central quando comparado ao grupo do LPS. Este resultado também foi verificado após administração concomitante de doxiciclina e escitalopram. Os dois em associação aumentaram o tempo e o número de entradas na zona central quando comparados com os animais tratados com LPS.

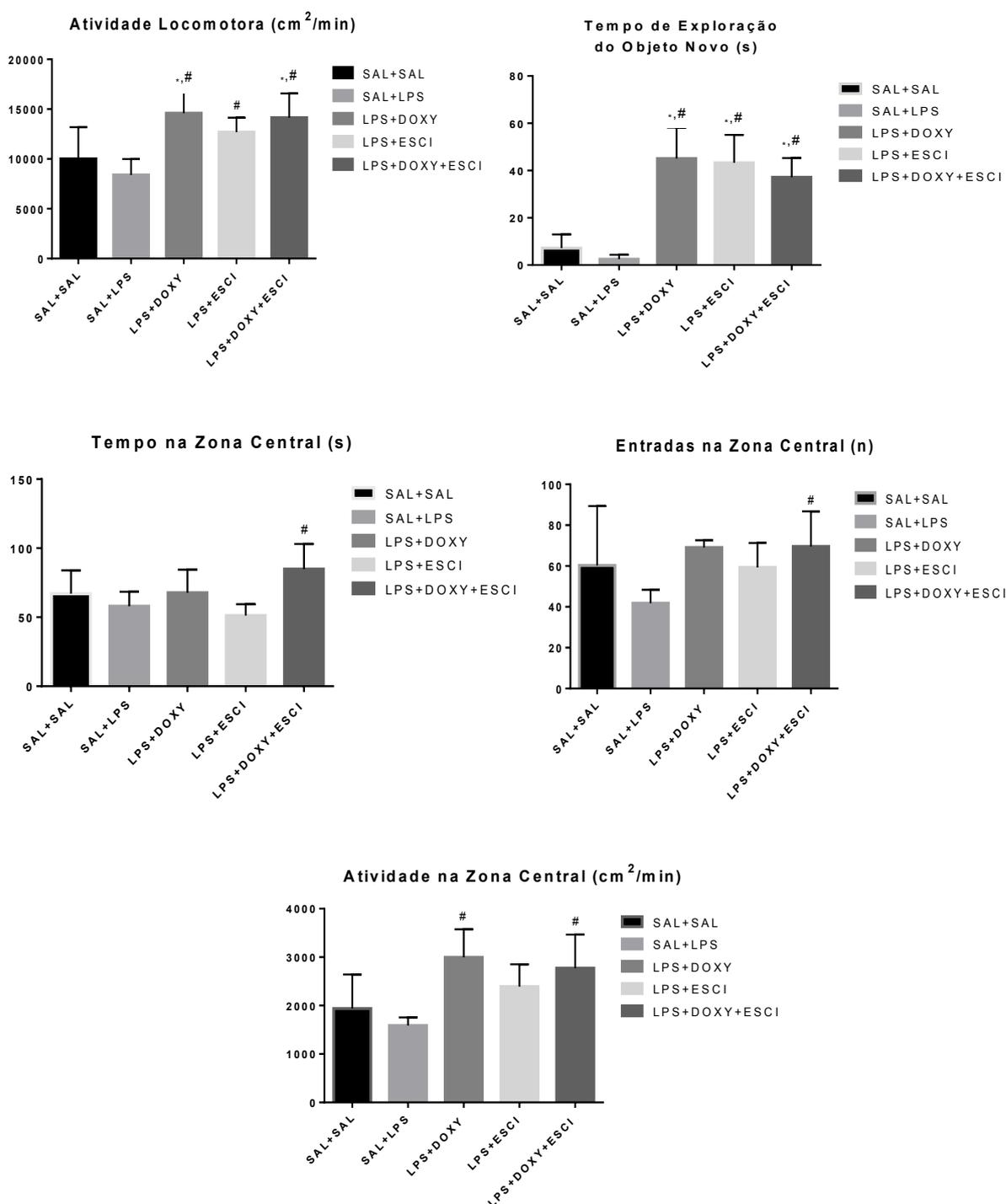


Figura 22 – Atividade locomotora no campo aberto em animais machos (n=10 animais/grupo) tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via seguida por Tukey *post test*. \*,#P <0,05 vs controle e LPS, respectivamente.

A figura 23 mostra o trajeto percorrido pelo animal na arena representado pela linha preta. A presença e o deslocamento do animal foram detectados pelo *software SMART*<sup>®</sup> a partir do seu centro de massa. A trajetória do animal do grupo do LPS foi menor comparado ao grupo controle, porém sem significância, sendo revertida após tratamento com doxiciclina (DOXY) e escitalopram (ESCI) sozinhos e em associação. O animal voltou a explorar todas as zonas, aumentando sua atividade locomotora.

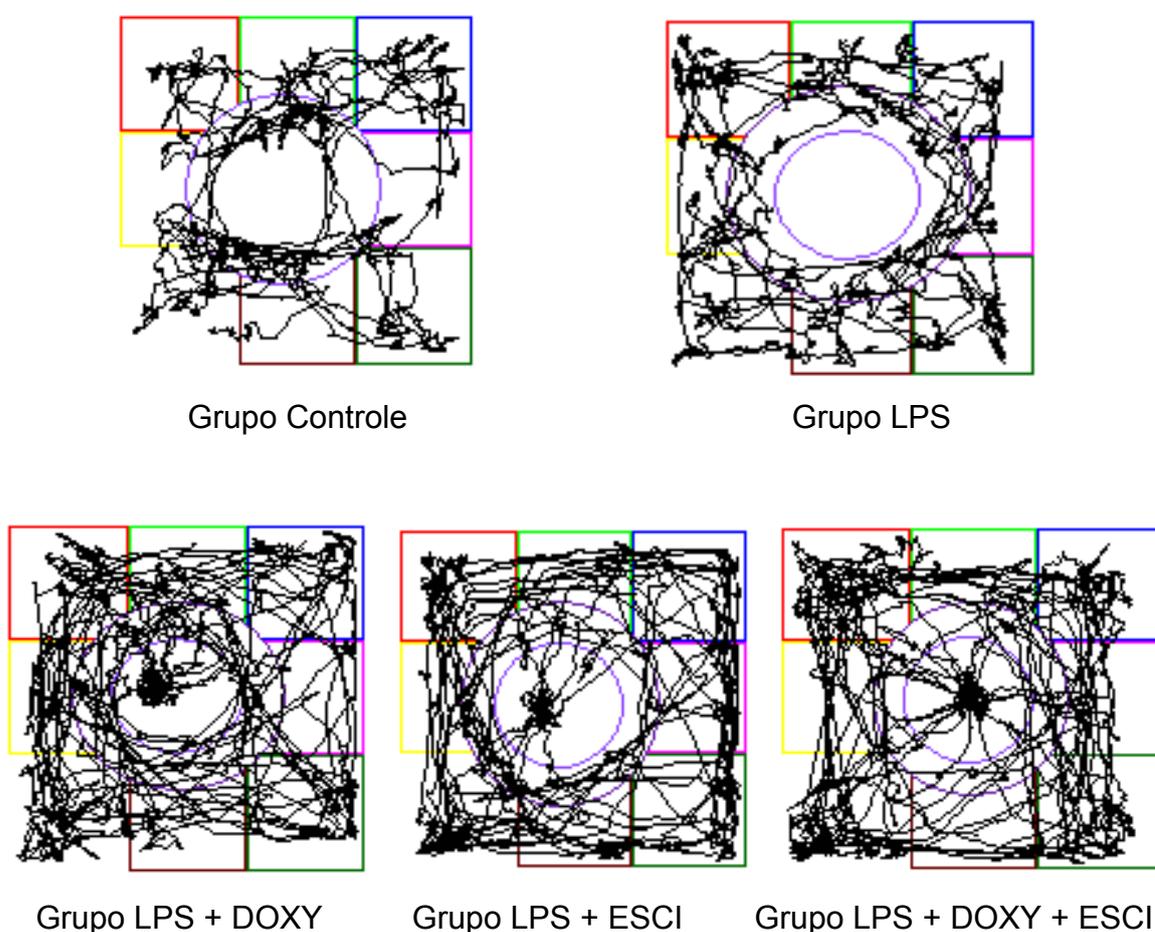


Figura 23 - Mapa do trajeto percorrido pelos animais no teste do campo aberto.

### 6.12 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre teste da alimentação suprimida pela novidade (*Novel Supressed Feeding Test*)

O LPS não induziu alteração no teste da alimentação suprimida pela novidade. Da mesma forma após o tratamento de doxiciclina ou escitalopram foi verificado que não houve nenhuma alteração significativa nos grupos experimentais. A cetamina (KET) foi utilizada como controle padrão.

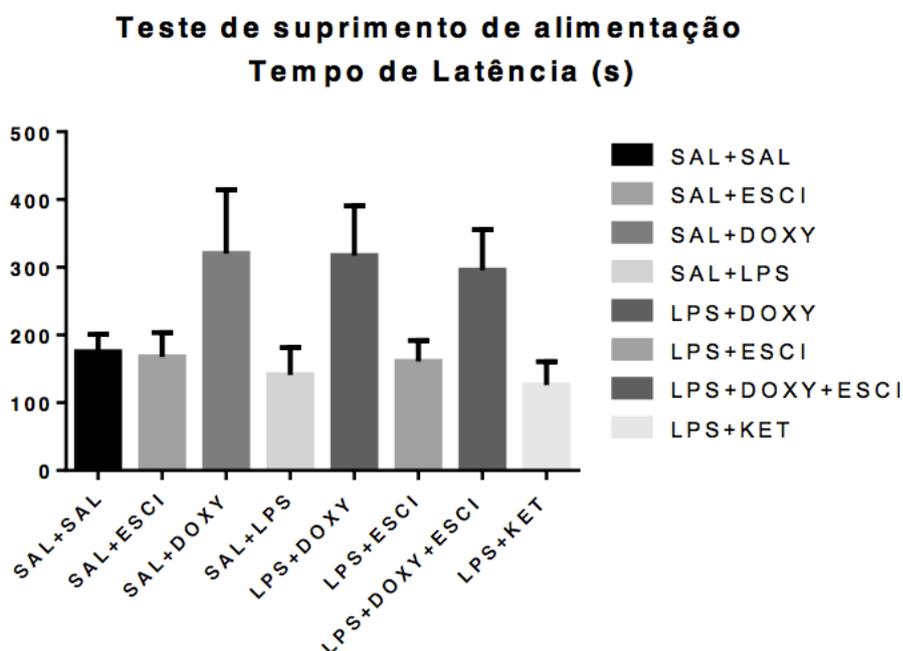


Figura 24 – Tempo de Latência no teste da alimentação suprimida pela novidade em animais machos (n=10 animais/grupo) tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média ± EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via seguida por Tukey *post test*.

### **6.13 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre o estresse oxidativo induzido por LPS**

No protocolo de pós-tratamento, não houve alterações significativas nos níveis de TBARS, conforme figura 25. Os níveis de TBARS e GSH não variaram pela administração repetida de LPS. A figura 26 evidencia as áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) analisadas 24h após a administração repetida de LPS e tratamento com doxiciclina (DOXY) e escitalopram (ESCI). Nas áreas do córtex pré-frontal, corpo estriado e hipotálamo houve aumento significativo nos níveis de GSH após administração de DOXY (10 mg/kg ip) quando comparado com os grupos salina (SAL) e ESCI. Na área do corpo estriado, os níveis de GSH aumentaram após administração de DOXY comparado aos grupos de LPS e ESCI e no grupo da administração concomitante de DOXY e ESCI, houve a diminuição dos níveis de GSH. Na área do hipocampo, houve um aumento significativo nos níveis de GSH após administração de DOXY (10 mg/kg i.p.) quando comparado com o grupo controle e os níveis de GSH também foram revertidos após administração de DOXY quando comparado ao grupo de LPS.

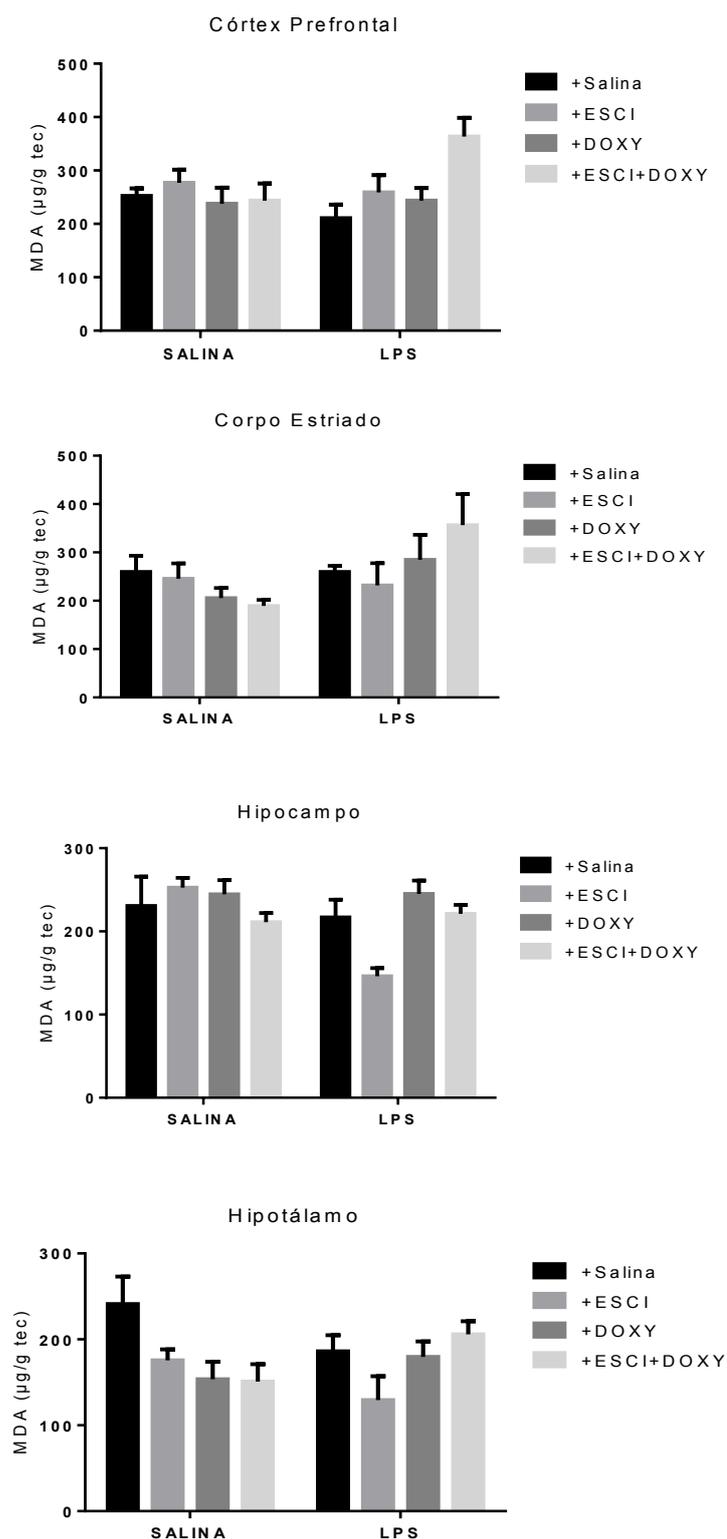


Figura 25 - Níveis de MDA em animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*.

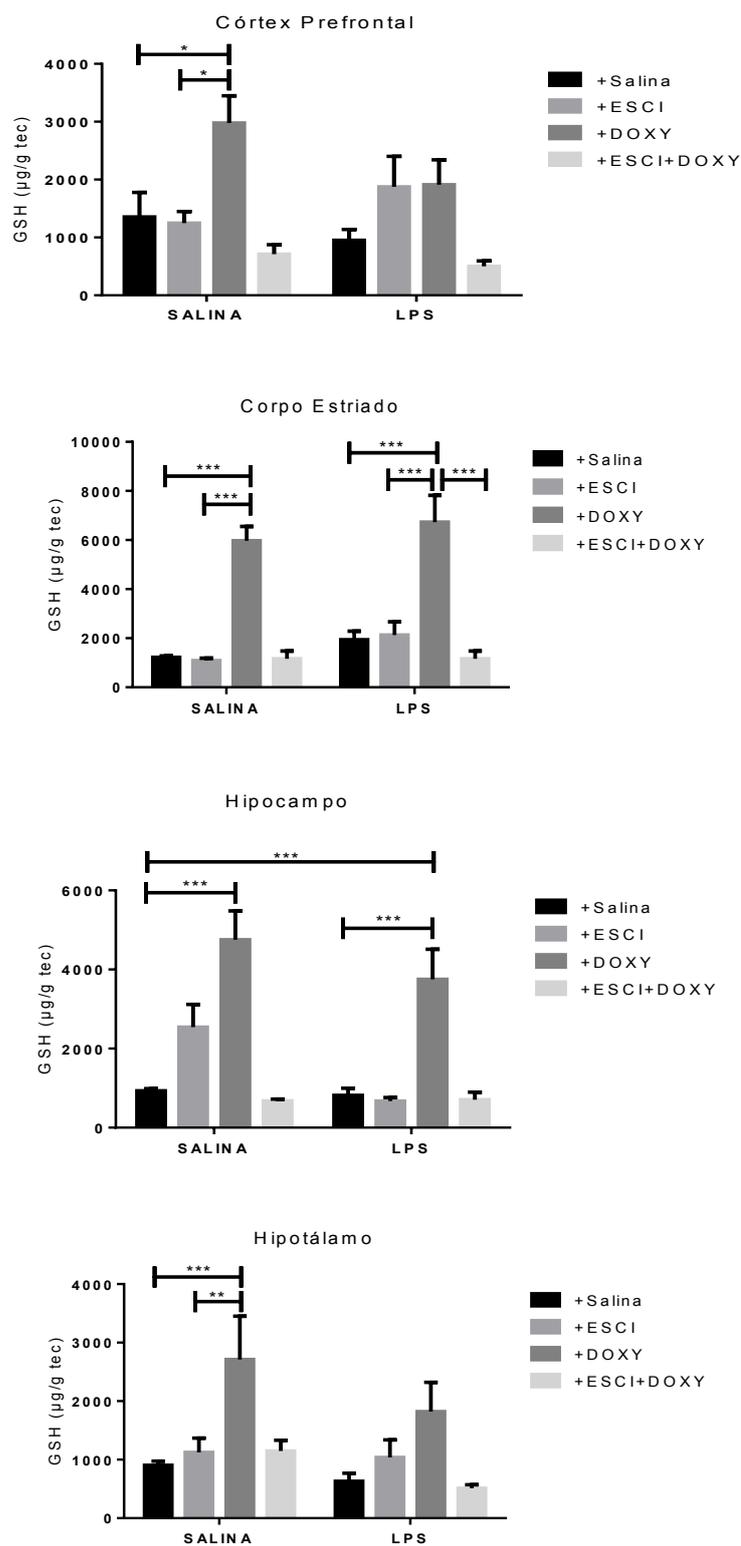


Figura 26 - Níveis de GSH em animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

#### **6.14 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre as alterações nos níveis de nitrito induzidas por LPS**

Nas áreas do córtex pré-frontal e hipotálamo, a administração repetida de LPS aumentou significativamente os níveis de nitrito comparado com o grupo salina e a administração de doxiciclina (DOXY) e escitalopram (ESCI), concomitantemente, reverteram esta alteração. Esta reversão também ocorreu após a administração de escitalopram (ESCI) e (DOXY) sozinhos. De forma semelhante, na área hipocampal foi verificada a redução dos níveis de nitrito após administração DOXY e ESCI em associação e sozinhos. Também foi verificado que após DOXY e DOXY + ESCI diminuíram os níveis basais de nitrito. No corpo estriado, foi verificado um aumento dos níveis basais de nitrito após ESCI, os quais foram diminuídos após DOXY + ESCI. No hipotálamo, também foi verificado um aumento dos níveis basais de nitrito após ESCI.

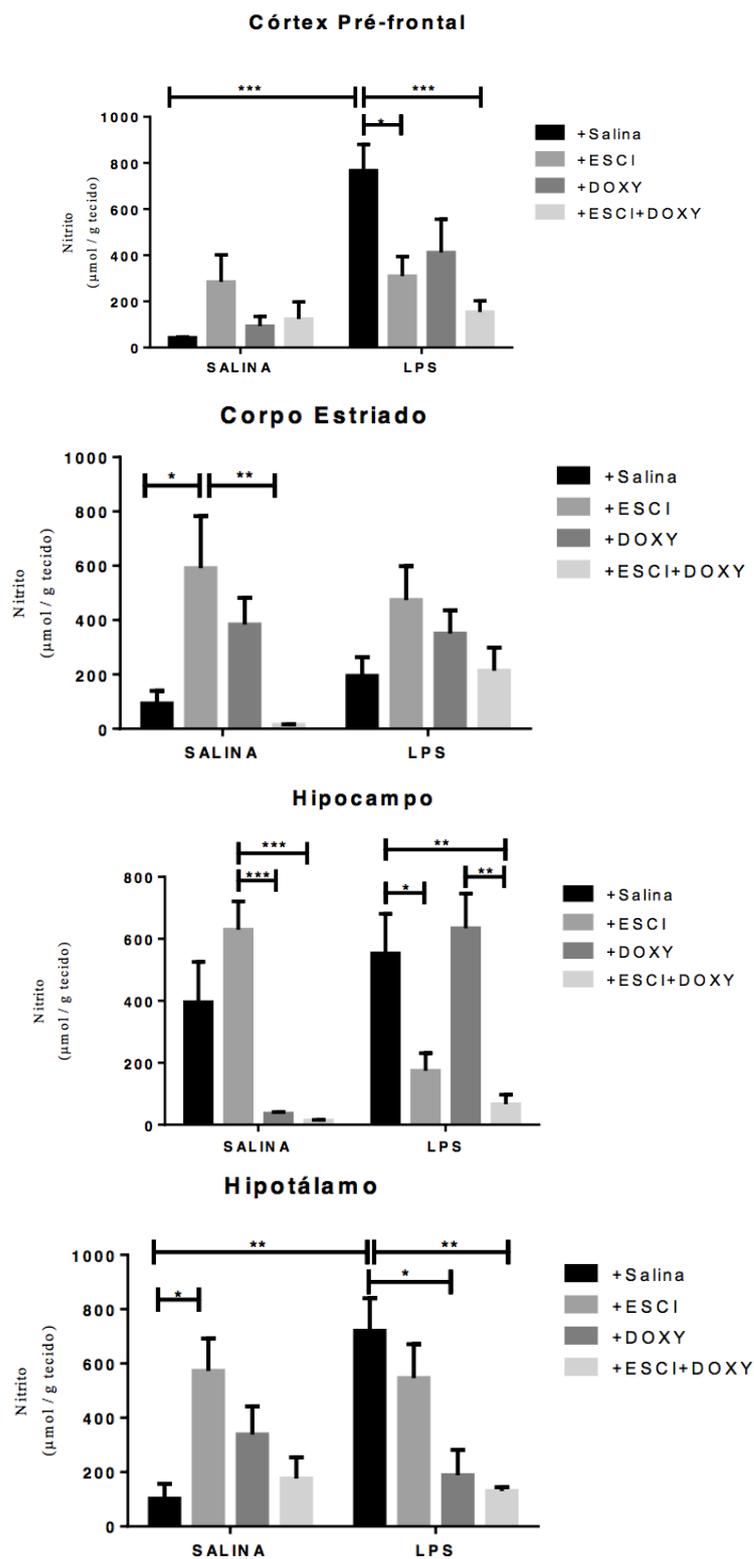


Figura 27 - Níveis de nitrito em animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

### 6.15 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão de proteína IBA-1 em animais expostos ao LPS

O marcador IBA-1 é expresso quando ocorre a ativação microglial em uma resposta neuroinflamatória no SNC. Os níveis de expressão proteica de IBA-1 tiveram um aumento significativo após administração de LPS comparado ao controle. Após administração de doxiciclina (DOXY), escitalopram (ESCI) sozinhos ou em associação houve uma diminuição dos níveis da expressão proteica de IBA-1 comparado ao grupo do LPS.

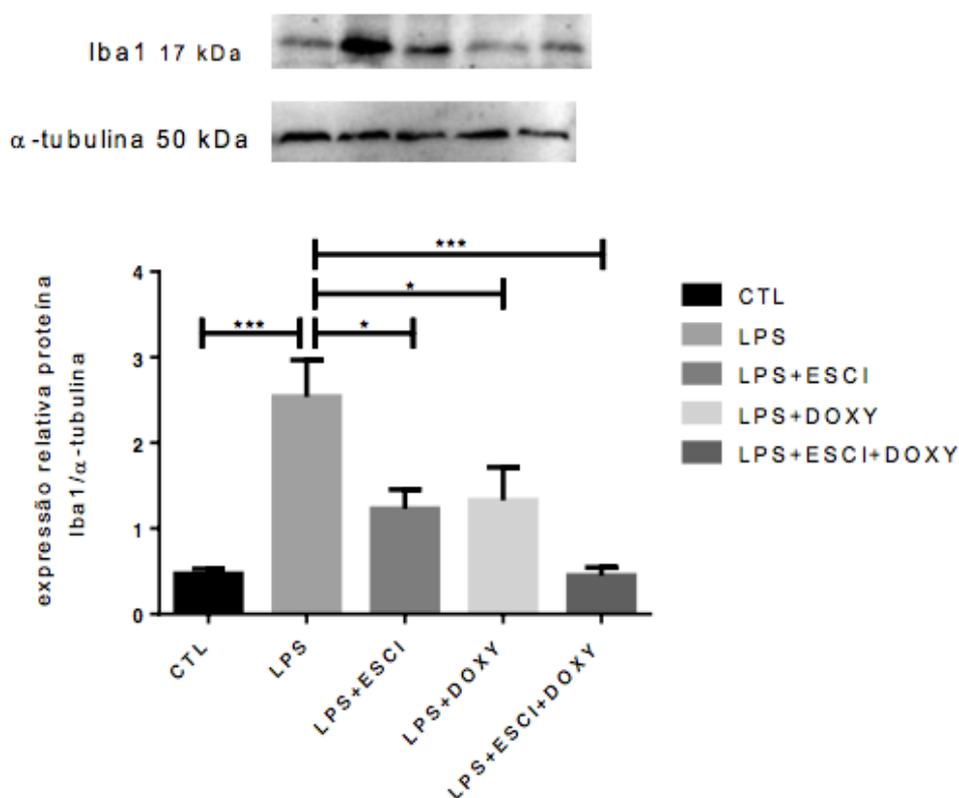


Figura 28 – Níveis de IBA-1 no hipocampo em animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

### 6.16 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em animais expostos ao LPS

O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) p65 é uma das frações responsáveis no núcleo pela transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, de quimiocinas e de moléculas de adesão. Os níveis de expressão proteica de NF- $\kappa$ B foram aumentados significativamente após administração de LPS quando comparado ao controle (CTL). O pós-tratamento com escitalopram (ESCI) ou doxiciclina (DOXY) não revertem as alterações neste fator de transcrição, porém a associação de ESCI + DOXY levou o NF- $\kappa$ B a níveis de controle.

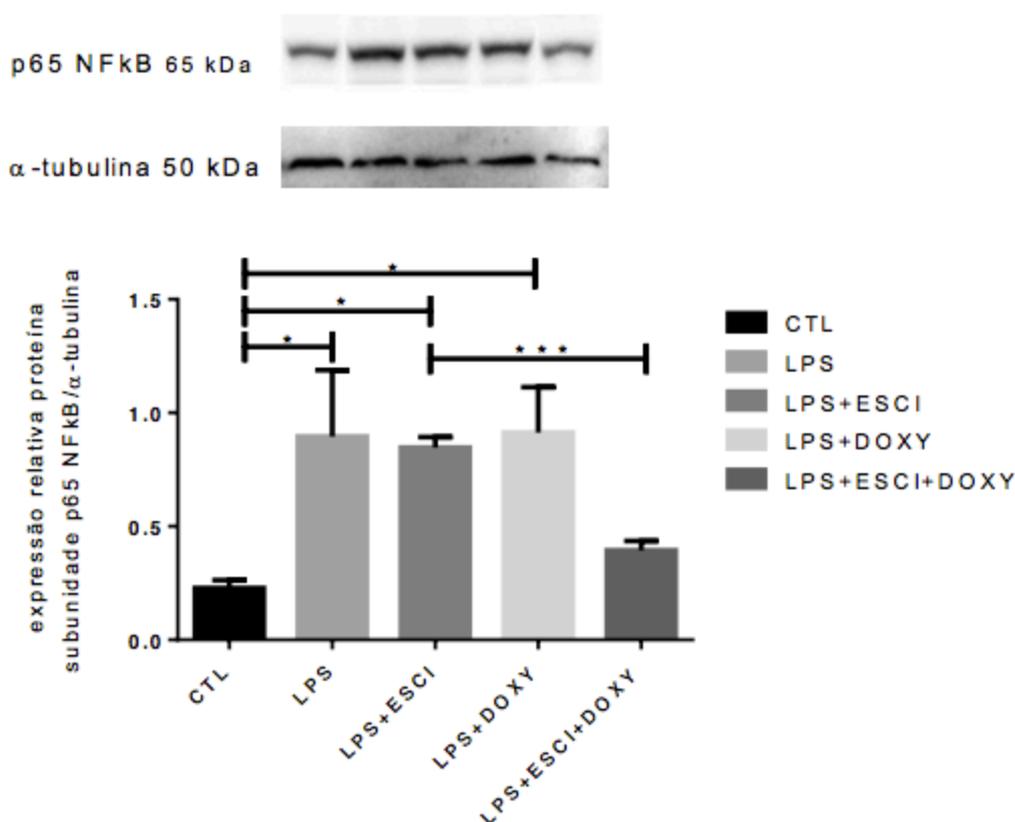


Figura 29 – Níveis hipocâmpais de NFκB em animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05.

### **6.17 Tratamento com doxiciclina ou escitalopram reverte as alterações nos níveis de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ induzidas por LPS**

Como as alterações de comportamento induzidas por LPS são dependentes da indução de citocinas pró-inflamatórias no cérebro, foram analisados os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , na área hipocampal. A administração repetida de LPS promoveu um aumento significativo nos níveis de IL-1 $\beta$ , os quais foram diminuídos após a administração de doxiciclina (DOXY). Esta reversão também foi verificada após administração concomitante de doxiciclina (DOXY) e escitalopram (ESCI). Em relação aos níveis de TNF- $\alpha$ , a administração de LPS promoveu um aumento significativo desses níveis, os quais foram revertidos com a administração de DOXY + ESCI em associação.

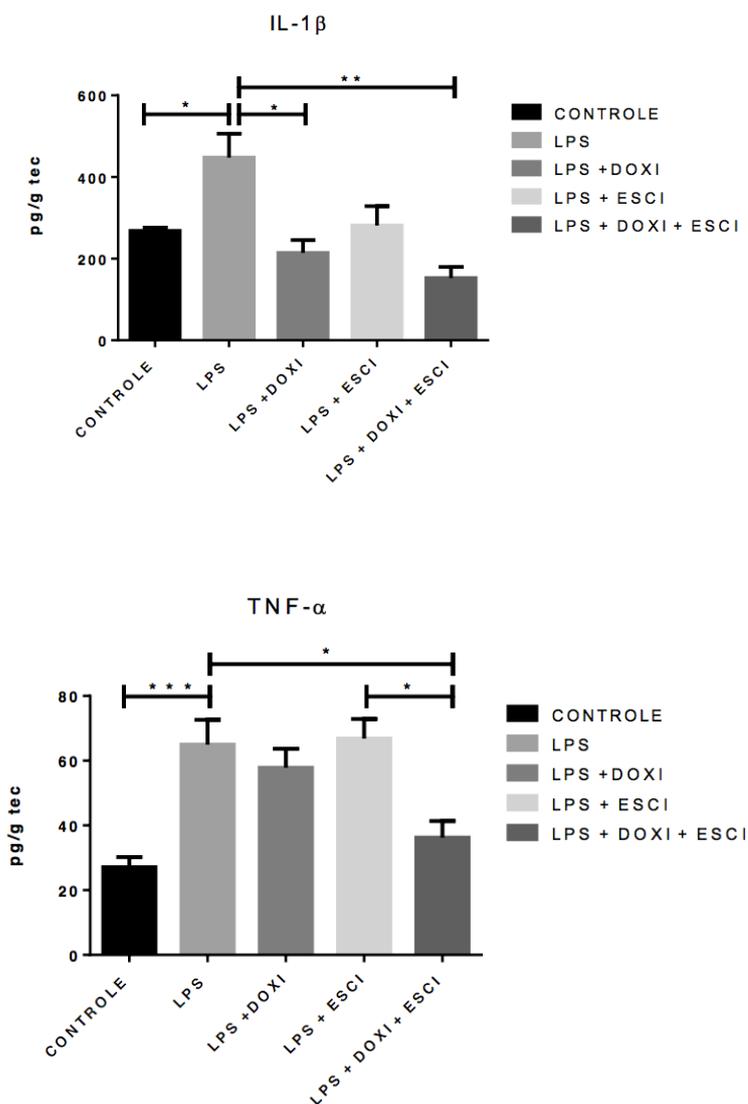


Figura 30 - Níveis hipocâmpicos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05, \*\*P <0,01, \*\*\*P <0,001.

### **6.18 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão da proteína ERK 1/2 fosforilada em animais expostos ao LPS**

A via de sinalização da ERK 1/2 está envolvida com a proliferação neural, diferenciação e neurogênese, desempenhando um papel importante na aprendizagem e na memória. Assim, neste trabalho foi verificada uma diminuição significativa nos níveis de expressão proteica de ERK1/2 fosforilada do grupo do LPS comparado ao controle. Houve um aumento significativo dos níveis de expressão proteica de ERK1/2 total após administração de doxiciclina (DOXY) comparado ao grupo do LPS e ao controle.

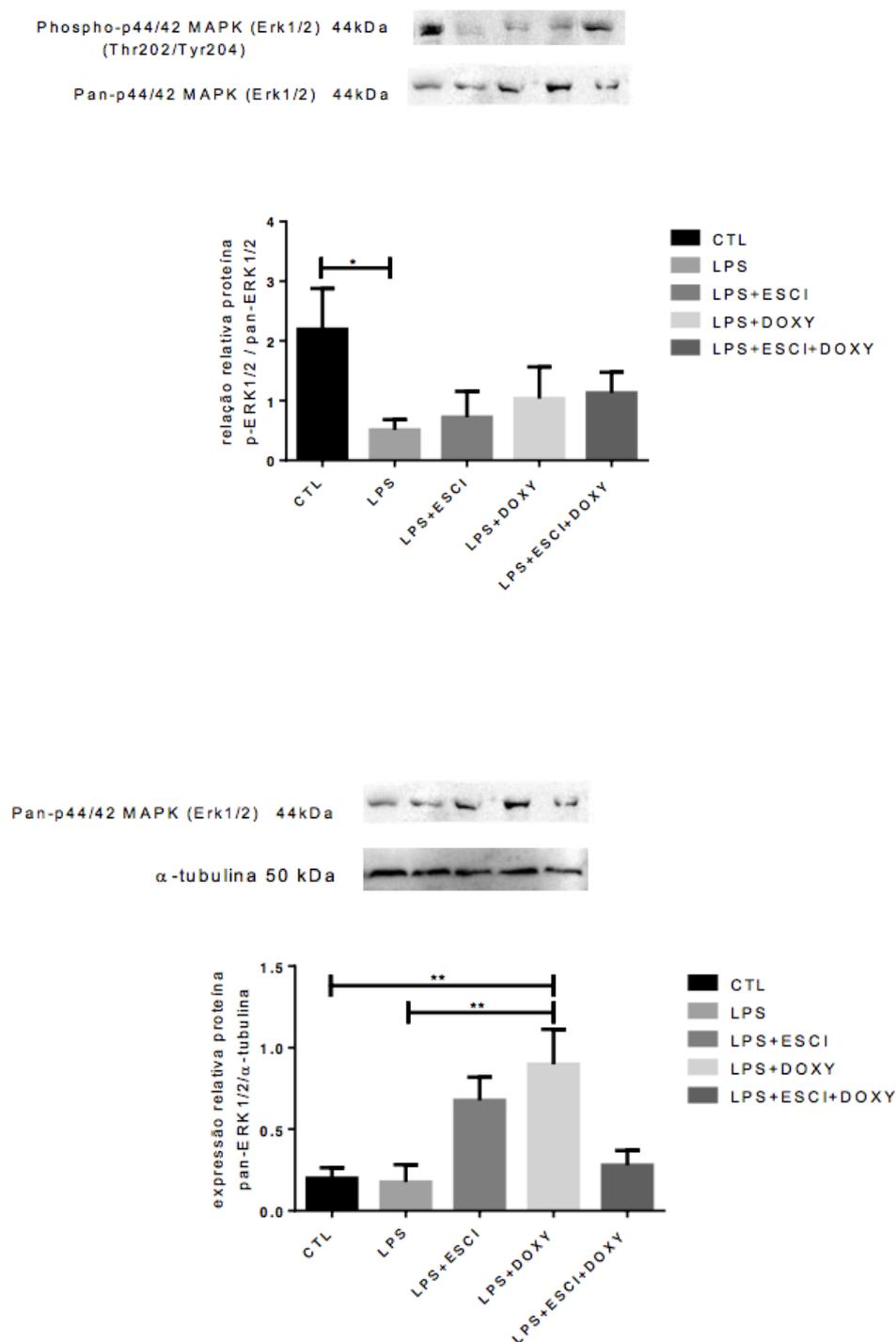


Figura 31 – Níveis de ERK1/2 fosforilada e total no hipocampo de animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

### 6.19 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão da proteína GSK-3 $\beta$ fosforilada em animais expostos ao LPS

A análise de *Western Blotting* verificou que houve uma diminuição nos níveis de expressão proteica de GSK-3 $\beta$  fosforilada após administração de LPS quando comparado ao controle (CTL). Após administração concomitante de doxiciclina (DOXY) e escitalopram (ESCI), houve um aumento significativo dos níveis da expressão proteica de GSK-3 $\beta$  fosforilada.

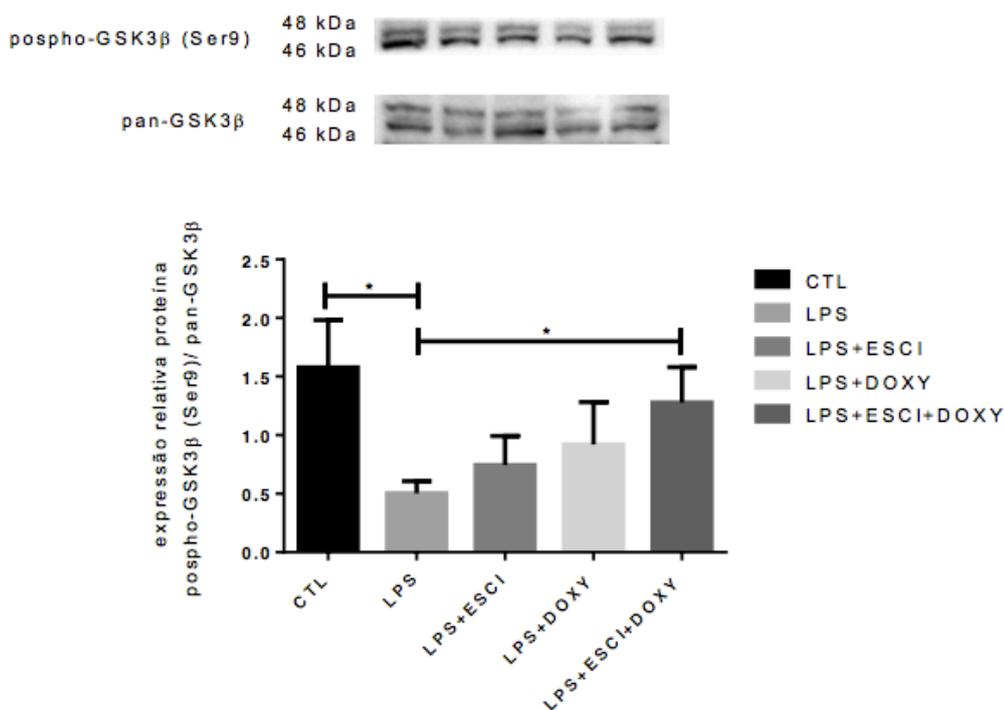


Figura 32 – Níveis de GSK-3 $\beta$  fosforilada e total no hipocampo de animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

## 6.20 Efeito do tratamento com doxiciclina ou escitalopram sobre a expressão de CREB fosforilado em animais expostos ao LPS

O CREB é um fator de transcrição celular e está envolvido em *déficits* emocionais, o qual possui várias vias de fosforilação. A análise de *Western Blotting* revelou que os níveis de expressão proteica de CREB fosforilado tiveram um aumento significativo após administração de doxiciclina (DOXY) comparado ao grupo do LPS e controle.

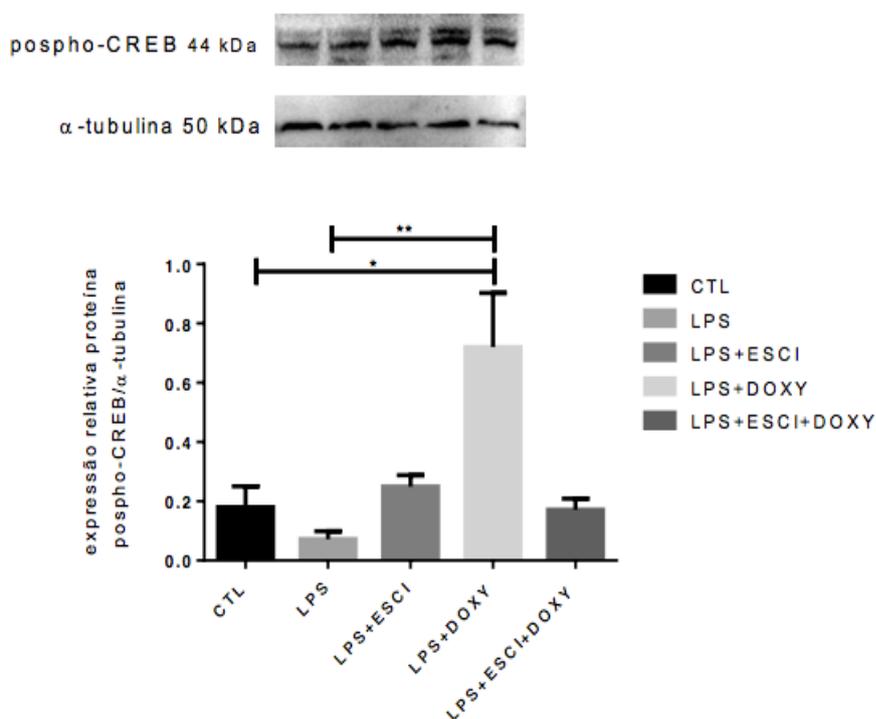


Figura 33 – Níveis de CREB fosforilado no hipocampo de animais machos tratados com doxiciclina (DOXY 10 mg/kg, ip) ou escitalopram (ESCI 4 mg/kg, ip), após administração repetida de LPS. As barras representam média  $\pm$  EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. \*P <0,05, \*\*P < 0,01.

A tabela 1 demonstra um resumo de todos os resultados obtidos no protocolo 1 (administração única de LPS), através dos testes comportamentais e neuroquímicos realizados, segundo os parâmetros avaliados e a manifestação de acordo com o gênero.

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos do Protocolo 1 pelo presente estudo:

TESTES	PARÂMETROS	MACHOS	FÊMEAS
<b>NADO FORÇADO</b>	Tempo de Imobilidade	↑	Não significativo
<b>PREFERÊNCIA POR SACAROSE</b>	Consumo de sacarose	↓↓	↓
<b>CAMPO ABERTO</b>	<i>Crossing/ Rearings</i> <i>Groomings/</i> Tempo no meio	Não significativo	Não significativo ↑ <i>groomings</i>
<b>LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (PLUZ MAZE)</b>	Entradas no braço aberto Tempo no braço aberto Tempo na plataforma central	Não significativo	↓ Número de entradas no braço aberto
<b>TBARS</b>	Estresse oxidativo	↑ HP	↑ HT
<b>GSH</b>	Estresse oxidativo (enzima antioxidante)	↓ CPF/↓↓↓ HP ↓↓↓ HT	↓ CPF/↓↓ HP ↓↓ HT
<b>MPO</b>	Atividade pró-inflamatória	↑↑ CPF	↑↑↑ CPF ↑↑ HP
<b>IL-1β</b>	Atividade pró-inflamatória	↑ CPF ↑↑↑ HT	↑ CPF ↑ HT
<b>BDNF</b>	Fator neutrófico	Não significativo	Não significativo

Fonte: elaborada pela autora.

A tabela 2 demonstra um resumo de todos os resultados obtidos no protocolo 2, através dos testes comportamentais, neuroquímicos e neuroinflamatórios realizados, segundo os parâmetros avaliados.

Tabela 2 - Resumo dos resultados obtidos do Protocolo 2 pelo presente estudo:

TESTES	GRUPO LPS	GRUPO DOXI	GRUPO ESCI	GRUPO DOXI+ESCI
<b>NADO FORÇADO</b>	↑ tempo de imobilidade	↓ tempo de imobilidade	↓ tempo de imobilidade	↓ tempo de imobilidade
<b>CAMPO ABERTO</b>	NS	↑ <i>crossing</i> ↑ atividade na zona central ↑ tempo de exploração do objeto novo	↑ <i>crossing</i> ↑ tempo de exploração do objeto novo	↑ <i>crossing</i> / ↑↑ atividade na zona central/ ↑ tempo, atividade na zona central/ ↑ tempo de exploração do objeto novo
<b>ALIM. SUPRI. PELA NOVIDADE</b>	NS	NS	NS	NS
<b>TBARS</b>	NS	NS	NS	NS
<b>GSH</b>	NS	↑CPF/↑↑↑HT/ ↑↑↑CE/↑↑↑HP	NS	NS
<b>NITRITO</b>	↑↑↑CPF/↑↑HT	↓ HT	↓ HP	↓↓ HT/ ↓↓ HP
<b>IBA-1</b>	↑↑↑	↓	↓	↓↓↓
<b>NF-κB</b>	↑	↑	↑	NS
<b>IL-1β</b>	↑	↓	NS	↓↓
<b>TNF-α</b>	↑↑↑	NS	NS	↓
<b>GSK3β</b>	↓ fosfoGSK3β	NS	NS	↑ fosfo-GSK3β
<b>ERK 1/2</b>	↓ fosfoERK1/2	↑↑ERK1/2 total	NS	NS
<b>CREB</b>	NS	↑↑ fosfoCREB	NS	NS

Fonte: elaborada pela autora.

## 7 DISCUSSÃO

Na primeira parte do presente estudo, demonstramos que após a exposição sistêmica e única de LPS provocou alterações comportamentais de forma diferenciada em machos e fêmeas. Somente os machos tiveram aumento no tempo de imobilidade, induzindo ao comportamento tipo-depressivo, enquanto que as fêmeas tiveram aumento no teste do labirinto cruz elevado, evidenciando um comportamento ansiogênico. Em ambos os sexos, ocorreu uma diminuição na preferência por sacarose, alterações oxidativas, aumento da atividade de mieloperoxidase e aumento dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ . Baseado nestes achados, a segunda parte do nosso estudo (protocolo 2) foi realizado apenas em camundongos machos, onde demonstramos que o antimicrobiano doxiciclina em combinação com o antidepressivo escitalopram, foi capaz de reverter alterações neuroquímicas, induzidas por LPS, de forma superior aos dois fármacos quando administrados isoladamente (DANTZER *et al.*, 2008, MELLO *et al.*, 2013).

O modelo do LPS está relacionado à indução de alterações inflamatórias, face ao potente efeito ativador do sistema imunitário desta endotoxina. Vários resultados de estudos com roedores indicaram que a administração sistêmica de LPS induz uma síndrome comportamental, incluindo características semelhantes a depressão (YIRMIYA, 1996; DANTZER *et al.*, 2008; CUSTODIO *et al.*, 2013, TOMAZ *et al.*, 2014). Com base nestes achados, estudos utilizaram efeitos comportamentais induzidos por LPS para esclarecer as associações entre a neuroinflamação e depressão (DUNN & SWIERGIEL, 2005; FU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2011). Por conseguinte, estudos demonstraram que os efeitos comportamentais, após desafio imune por LPS, são dependentes do tempo e evidentes 24h pós-tratamento (PARK *et al.*, 2011; OHGI *et al.*, 2013, CUSTODIO *et al.*, 2013, TOMAZ *et al.*, 2014).

- O sexo influencia as alterações comportamentais induzidas por LPS.

No presente trabalho, os animais machos e fêmeas apresentaram alterações comportamentais distintas quando expostos ao desafio imune por LPS. De fato, os resultados do teste nado forçado confirmaram, após 24 horas da administração única de LPS (0,5 mg/kg), o aumento do tempo de imobilidade e, assim, induzindo o comportamento tipo-depressivo, somente nos camundongos machos. Esse teste é padrão ouro para verificação de comportamentos semelhantes a depressão (CRYAN & HOLMES, 2005) e evidencia um modelo animal de "desespero comportamental" (PORSOLT *et al.*, 1977).

Em relação às fêmeas, não houve alterações significativas no tempo de imobilidade. Há relatos de influência das alterações do ciclo estral nos efeitos comportamentais e neuroquímicos mediados pelo LPS, portanto, existem variações de comportamento no teste do nado forçado durante as diferentes fases do ciclo estral (CONTRERAS *et al.*, 1998; FRYE & WALF, 2002; CONSOLI *et al.*, 2005), o que não foi avaliado no presente estudo. Em estudos anteriores foi relatado o aumento do tempo de imobilidade durante a fase proestro/estro (CONTRERAS *et al.*, 1998; FRYE & WALF, 2002; MARVAN *et al.*, 1996). Em contraste com nossos resultados, Tonelli *et al.*, 2008, verificaram um aumento de imobilidade das fêmeas durante as fases proestro/estro e diestro, mostrando uma alteração do comportamento independente da fase do ciclo estral.

Outro sintoma central da depressão é a anedonia, uma diminuição da capacidade de experimentar o prazer (HAMILTON, 1967; KLEIN, 1974; KESSLER *et al.*, 1994; TOMAZ *et al.*, 2014). A partir desta evidência, foi realizado o teste preferência por sacarose, um método utilizado para determinar *déficits* motivacionais (RYGULA *et al.*, 2005). Como resultado, observamos a diminuição da preferência por sacarose em ambos os sexos após o tratamento com LPS, evidenciando um efeito anedônico, um dos principais sintomas depressivos. Este achado corrobora com um estudo recente que evidenciou a anedonia, igualmente estabelecida em camundongos machos e fêmeas, após administração única de LPS (SENS *et al.*, 2017).

Os nossos resultados indicaram que após exposição ao LPS, a atividade locomotora permaneceu inalterada em ambos os sexos, apenas o número de *groomings* foi aumentado significativamente nas fêmeas. Este achado corrobora com um estudo recente, o qual verificou que a atividade locomotora foi diminuída em ambos os sexos, após 6h da administração de LPS, mas essa deficiência locomotora não foi evidente após 24h (SENS *et al.*, 2017), bem como estudos anteriores nos quais a atividade locomotora em camundongos foi diminuída até 6h após a administração de LPS, normalizando 24h pós-LPS (O'CONNOR *et al.*, 2009; OHGI *et al.*, 2013). A diminuição na atividade locomotora é interpretada como um comportamento de doença, "*sickness behavior*" (CUSTODIO *et al.*, 2013), distinto do comportamento tipo-depressivo, que ocorre 24h após LPS (FRENOIS *et al.*, 2007, CUSTODIO *et al.*, 2013; TOMAZ *et al.*, 2014). Portanto, em nosso estudo, podemos reconhecer que os animais tiveram um comportamento tipo-depressivo e não um comportamento de doença.

Outro comportamento evidenciado em nossos resultados foi um comportamento ansiogênico, somente nas fêmeas, através da diminuição do número de entradas no braço aberto no labirinto em cruz elevado (*plus maze*) e aumento no número *groomings* no teste do campo aberto. Este achado corrobora com as diferenças de sexo demonstradas entre homens e mulheres em relação aos transtornos de humor (BEBBINGTON, 1998; MCCARTHY *et al.*, 2005; KARATSOREOS & MCEWEN, 2011), sendo as mulheres mais frequentemente diagnosticadas com transtornos de ansiedade (WEICH *et al.*, 2001). Um estudo realizado com seres humanos, após a administração de LPS (0,4 ng/kg), induziu um aumento nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e o cortisol, acompanhado por uma diminuição no humor e um aumento da ansiedade (GRIGOLEIT *et al.*, 2011; KULLMANN *et al.*, 2012).

Portanto, considerando as avaliações comportamentais realizadas neste estudo, machos e fêmeas apresentaram alterações comportamentais diferenciadas, após desafio imune por LPS. Ambos os sexos apresentaram comportamentos anedônicos, porém os machos demonstraram uma inabilidade de lidar com eventos estressores no teste do nado forçado, enquanto que as fêmeas apresentaram distúrbios afetivos, demonstrado pelo comportamento ansiogênico. Com estes

resultados, demonstramos que o dimorfismo sexual predomina na manifestação de respostas comportamentais.

- *Influência do sexo nas alterações oxidativas após desafio imune por LPS.*

Há evidências que a depressão é uma doença inflamatória e a ativação de vias inflamatórias e oxidativas e de estresse nitrosativo (IO&NS) é um fator fisiopatológico chave na depressão (MAES, 2008). A glutatona reduzida (GSH) é um forte antioxidante endógeno que protege as células contra os danos causados pelos radicais livres. É usada pelos glóbulos brancos como fonte de energia utilizada para a linfoproliferação. Portanto, a GSH pode ajudar a aumentar a resistência às infecções bacterianas e virais (MAES *et al.*, 2011). Em nossos resultados, foi demonstrado que 24h após a administração de LPS, houve uma diminuição significativa no conteúdo de GSH em todas as áreas cerebrais, de ambos os sexos. Nesse contexto, a depleção de GSH pode contribuir para o estresse oxidativo, dano mitocondrial e morte celular nos neurônios, características demonstradas na depressão (ROSA *et al.*, 2013). Evidências experimentais associam a deficiência de GSH e o aumento de estresse oxidativo na fisiopatologia da maioria dos transtornos psiquiátricos (BERK *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2013).

Peroxidação lipídica se refere ao dano a lipídeos de membrana causado pelo excesso de radicais livres ou queda das defesas antioxidantes. Há fortes evidências que a presença do aumento do estresse oxidativo está associado a distúrbios comportamentais, como a depressão e a ansiedade (BILICI *et al.*, 2001; KULOGLU *et al.*, 2002a, b; RAMMAL *et al.*, 2008a, b; BOUAYED *et al.*, 2007b, 2009b). No presente estudo, foi verificado um aumento de MDA no hipotálamo das fêmeas e no hipocampo dos machos. Em consonância com nossos resultados, estudos realizados em pacientes com depressão, verificaram níveis elevados de MDA no sangue desses pacientes quando comparados com pacientes saudáveis (SARANDOL *et al.* 2007; GALECKI *et al.*, 2007; GALECKI *et al.*, 2009a). Em outro estudo, verificou-se um aumento significativo dos níveis de peróxido no plasma desses pacientes (MAES *et al.*, 2010a).

Baseado nessas evidências, várias vias da O&NS podem contribuir para elucidar a patogênese da depressão. Uma vez que, os níveis de antioxidantes são diminuídos, existe uma maior responsividade inflamatória, a qual pode ser acompanhada pelos níveis mais elevados de citocinas e, portanto, sintomas mediados pela inflamação. Outro caminho relacionado, seria a indução da via do metabolismo do triptofano por mecanismos inflamatórios e oxidantes atuando na enzima IDO. Esta ativação da IDO está relacionada a diminuições nos níveis de triptofano, serotonina e aumento dos níveis de catabólitos neurotóxicos de triptofano, por exemplo o ácido quinolínico, contribuindo para efeitos depressogênicos e ansiogênicos (MAES *et al.*, 1994). Nessa mesma linha, outra via seria a nitração de proteínas funcionais, danos ao DNA e mitocôndrias, podendo causar processos degenerativos, como indução de caminhos de apoptose celular (KUBERA *et al.*, 2010). Portanto, o estresse oxidativo e nitrosativo, pode contribuir para processos neurodegenerativos na depressão.

*- Influência do sexo nas alterações inflamatórias do cérebro e neurotróficas em camundongos adultos expostos ao LPS.*

Foram estabelecidas associações significativas entre a atividade da mieloperoxidase (MPO) e as alterações inflamatórias. A MPO é uma enzima específica mielóide, expressa por neutrófilos, monócitos, células microgлияis (YAP *et al.*, 2007) e neurônios (GREEN *et al.*, 2004; LORIA *et al.*, 2008), a qual gera espécies oxidantes potentes, como o ácido hipocloroso (SPICKETT *et al.*, 2000) e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (LEFKOWITZ & LEFKOWITZ, 2008). Durante os processos inflamatórios crônicos, a ativação do MPO está envolvida no dano celular (MALLE *et al.*, 2007). Em nossos resultados, foi verificado o aumento da atividade de MPO, nas áreas do córtex pré-frontal e hipocampo nas fêmeas e no córtex pré-frontal nos machos. Também foi demonstrado que os machos possuem níveis basais mais elevados de MPO, quando comparados às fêmeas. Este achado corrobora com diversos estudos que apontaram o envolvimento de níveis elevados da atividade de MPO a alterações inflamatórias e ROS em doenças, tais como arteriosclerose, esclerose múltipla, Mal de Alzheimer (VELLOSA *et al.*, 2013), esquizofrenia (AL-ASMARI & KHAN, 2014), autismo (ROSE

*et al.*, 2012) e depressão (GALECKI *et al.*, 2010).

Há fortes evidências que associaram as moléculas de sinalização imune às citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento de distúrbios depressivos (DUNN, 2006; DUNN & SWIERGIEL, 2005; DUNN *et al.*, 2005; DANTZER *et al.*, 2008; MAES *et al.*, 2012b). A desregulação da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  é evidenciada sobre as alterações comportamentais e de humor, pois as citocinas pró-inflamatórias foram propostas por desempenhar um papel causador na fisiopatologia da depressão (DANTZER *et al.*, 1999), devido a indução de comportamento tipo-depressivo e comportamento de doença (KONSMAN *et al.*, 2002). A administração periférica e central de IL-1 $\beta$  induz todos os componentes centrais da reação de fase aguda, incluindo febre, ativação do eixo HPA e depressão comportamental (ANFORTH *et al.*, 1998).

No presente estudo, foi verificado o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ , em ambos os sexos, nas áreas do córtex pré-frontal e hipotálamo, após administração única de LPS, evidenciando a ativação do eixo HPA. Também foi verificado que os machos possuem níveis basais mais elevados de IL-1 $\beta$ , quando comparados às fêmeas. Na mesma linha de descobertas, um estudo realizado por Custodio *et al.*, 2013, demonstrou o aumento de níveis de IL-1 $\beta$ , na área do córtex-pré-frontal em machos, 24h após desafio imune por LPS. Portanto, a estimulação por LPS é mediada principalmente pela liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , os quais podem ativar todos os níveis do eixo HPA (PEPELS *et al.*, 2004).

As respostas inflamatórias e neuroimunes também estão associadas aos fatores neurotróficos, os quais estão envolvidos com a proteção e reparação dos neurônios. Baseado nisto, em nossas condições experimentais, não observamos alteração significativa nos níveis de BDNF em ambos os sexos, embora tenha aumentado esse parâmetro nas fêmeas, em comparação com os machos, tratados com o mesmo veículo LPS, na área hipotâmica. Este achado corrobora com estudo anterior, no qual não foi observado diminuições nos níveis de BDNF, na área do hipocampo, em camundongos machos (MELLO *et al.*, 2013). O BDNF está associado à plasticidade neuroprotetiva e sináptica no SNC (AUTRY & MONTEGGIA, 2012), especialmente no hipocampo (WATERHOUSE *et al.*, 2012; HARRISBERGER, 2015). Porém, grande número de evidências apontam para uma correlação entre a redução nos níveis de BDNF à depressão (TALIAZ *et al.*, 2010).

Outros estudos, realizados em pacientes com depressão maior, apresentaram uma diminuição dos níveis séricos de BDNF (CUNHA *et al.*, 2006; BRUNONI *et al.*, 2008).

Em conjunto com todos os resultados do protocolo 1, é possível interpretar que os camundongos fêmeas tiveram alterações inflamatórias e oxidativas evidenciado nos circuitos hipocampo-hipotálamo, justificado pelo surgimento de um fenótipo ansiogênico, uma vez que estas áreas cerebrais são importantes nos circuitos reguladores da ansiedade e resposta ao estresse (DUVAL *et al.*, 2015). Por outro lado, em animais machos, a predominância de alterações inflamatórias e oxidativas foram nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo, áreas-chave para a regulação do circuito de recompensas (RUSSO & NESTLER, 2013), devido o desenvolvimento de um comportamento tipo-depressivo de desespero.

*- Reversão das alterações comportamentais e sintomas da depressão induzidos por doxiciclina ou escitalopram.*

Como supracitado, há fortes evidências que revelam uma estreita ligação entre a inflamação e a depressão (DANTZER, 2006, 2012; O'CONNOR *et al.*, 2009; GALECKI *et al.*, 2012; LEONARD & MAES, 2012; MAES, 2008, 2010; MAES *et al.*, 2012; KROGH *et al.*, 2013; PATKI *et al.*, 2013; ZEUGMANN *et al.*, 2013). Assim, viemos propor uma nova terapia, utilizando um antimicrobiano doxiciclina e um antidepressivo escitalopram, sozinhos ou em associação, como tratamento para as alterações depressão-símile induzidas pela administração repetida de LPS.

A doxiciclina, tetraciclina de segunda geração, foi o antimicrobiano utilizado para reverter as alterações comportamentais, oxidativas e inflamatórias induzidas pelo desafio imune repetido por LPS, devido as tetraciclina possuírem atividades anti-inflamatórias, neuroprotetoras e anti-apoptóticas, além de seus efeitos antimicrobianos (DOMERCQ E MATUTE, 2004; JIANG *et al.*, 2012; GARRIDO-MESA *et al.*, 2013). Por outro lado, a maioria dos estudos anteriores foi dedicada à minociclina, em vários modelos de animais, como encefalomielite autoimune experimental (HOWELL *et al.*, 2010), Mal de Parkinson (SHAN *et al.*, 2011) e Mal de Alzheimer (MALM *et al.*, 2008). A partir disso, decidimos verificar os efeitos da doxiciclina em um modelo de animal com comportamento tipo-depressivo.

A escolha do antidepressivo escitalopram, sozinho ou em associação com doxiciclina, ocorreu por ser um dos fármacos de escolha para o tratamento da depressão (MUNOZ-BELLIDO *et al.*, 2000a; LIEB, 2004). Vale destacar que fármacos antidepressivos apresentam efeitos antimicrobianos e, por outro lado, os antimicrobianos como,  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, fluoroquinolonas também apresentam propriedades antidepressivas (AHMED *et al.*, 2011; MIYAOKA *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2013). Nesse sentido, a ceftriaxona possui a capacidade de aumentar a captação de glutamato por meio do aumento da expressão do transportador de glutamato, apresentando propriedades neuroprotetoras em modelos animais de depressão (ROTHSTEIN *et al.*, 2005; MINEUR *et al.*, 2007).

No presente estudo, a exposição de LPS por 10 dias, induziu comportamentos tipo-depressivos em roedores machos, através do teste do nado forçado, teste padrão utilizado para alteração comportamental de depressão-símile em animais. Este achado corrobora com outro estudo anterior, que realizou administração de LPS durante 7 dias, verificando um aumento do tempo de imobilidade no nado forçado e, desse modo, induziu um comportamento tipo-depressivo em roedores machos (ADZIC *et al.*, 2015). Em outro estudo, após desafio imune por LPS por 11 dias, verificou-se um aumento do tempo de imobilidade no nado forçado, evidenciando comportamento tipo-depressivo em animais (GUO *et al.*, 2014).

Nos animais tratados com a doxiciclina, demonstramos que esta droga reverteu a imobilidade induzida pelo LPS de forma semelhante ao escitalopram. O tratamento diminuiu significativamente o tempo de imobilidade, indicando que a doxiciclina possui um efeito antidepressivo semelhante ao escitalopram. Este achado corrobora com o estudo realizado por Mello *et al.*, 2013, que mostrou o pré e pós-tratamento com doxiciclina (25 e 50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg) preveniram e reverteram o tempo de imobilidade, após exposição ao LPS. Por outro lado, um estudo utilizando um pré-tratamento com escitalopram (10 mg/kg), R-citalopram e reboxetina, foi verificado apenas uma diminuição no tempo de imobilidade, no grupo do escitalopram, não sendo observado nenhuma alteração após o R-citalopram e escitalopram + reboxetina (DONG *et al.*, 2016). Além disso, as duas drogas administradas concomitantemente, diminuíram ainda mais esse tempo de imobilidade, evidenciando um efeito aditivo na ação dessas drogas em reverter esse

comportamento tipo-depressivo.

No protocolo 2 do presente estudo, após 10 dias de exposição ao LPS, a atividade locomotora permaneceu inalterada. Nesse sentido, um estudo realizado por Ge *et al.*, 2015, verificou que após uma administração de LPS por 7 dias, a atividade locomotora em ratos não foi alterada. Nossos resultados, evidenciaram que os animais machos permaneceram com comportamento tipo-depressivo e o tratamento com doxiciclina e escitalopram, sozinhos e em associação, aumentaram a atividade locomotora, tempo e atividade na zona central e o tempo de exploração do objeto novo desses animais. Um estudo realizado por Mello *et al.*, 2013, mostrou que a atividade locomotora não sofreu alteração após pré ou pós-tratamento agudo de doxiciclina e imipramina.

Outro teste comportamental realizado foi o teste da alimentação suprimida pela novidade, no qual não foi verificado nenhuma alteração significativa. Este teste foi utilizado para verificar se as estratégias antidepressivas utilizadas no presente trabalho apresentavam efeito antidepressivo rápido, visto que este teste foi validado para esta finalidade. Da mesma forma, a doxiciclina ou o escitalopram também não tiveram nenhuma alteração significativa. Contrariamente a estes resultados, Guo *et al.*, 2014, evidenciou que o tratamento repetido com LPS por 12 dias, aumentou significativamente a latência para alimentação.

*- Reversão das alterações nos níveis de estresse oxidativo e nitrito induzidas por doxiciclina ou escitalopram.*

A inflamação e o estresse oxidativo estão ligados a uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, doença renal crônica e câncer (BISWAS & LOPES DE FARIA, 2006; BISWAS & LOPES DE FARIA, 2007; CACHOFEIRO, 2008; BISWAS *et al.*, 2008; AMBADE & MANDREKAR, 2012; TUCKER *et al.*, 2015). As células inflamatórias liberam uma série de espécies reativas no local da inflamação, levando ao estresse oxidativo (CHUNG *et al.*, 2010; SPULBER *et al.*, 2012). Por outro lado, uma série de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio podem iniciar a cascata de sinalização intracelular que aumenta a expressão genética pro-inflamatória (ANDERSON *et al.*, 1994;

FLOHE *et al.*, 1997). Portanto, a inflamação e o estresse oxidativo e nitrosativo são eventos fisiopatológicos estreitamente ligados entre si.

No presente estudo, não houve alterações significativas nos níveis de MDA, após administração repetida por LPS. Nesse contexto, Maes *et al.*, 2010a, realizou um estudo com pacientes deprimidos, o qual foi verificado que os níveis de peróxido foram significativamente maiores em pacientes na fase mais aguda de sua doença, em comparação aos pacientes que sofriam de depressão crônica, por mais de dois anos de duração. Portanto, o aumento dos níveis de peróxido é verificado em pacientes que estão em uma fase mais aguda da doença, podendo ocorrer a normalização das ROS quando a depressão tender-se a tornar mais crônica. Nessa mesma linha de descobertas, um estudo realizado por Mello *et al.*, 2013, mostrou o aumento dos níveis de TBARS nas áreas do hipocampo e córtex-pré-frontal, após exposição única de LPS, os quais foram revertidos após administração aguda de doxiciclina (50 mg/Kg) e imipramina (10 mg/kg).

A exposição sistêmica repetida de LPS promoveu uma diminuição de antioxidantes endógenos em áreas cerebrais relacionadas à regulação do humor. A partir disto, verificou-se que tanto a doxiciclina como o escitalopram, aumentaram os níveis de GSH, nas áreas do hipocampo e corpo estriado, revertendo essas alterações. Também foi verificado que a doxiciclina aumentou os níveis basais de GSH em comparação aos grupos de salina e escitalopram. Este achado corrobora com um estudo realizado por Mello *et al.*, 2013, que mostraram que o pós-tratamento com doxiciclina (50 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg) foi capaz de reverter a diminuição dos níveis de GSH, nas áreas do hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, após exposição ao LPS. Nossos resultados estão de acordo com os efeitos antioxidantes descritos anteriormente da doxiciclina (NOGUEIRA *et al.*, 2011), sugerindo-se que os mecanismos antioxidantes desempenham um papel na ação antidepressiva desse fármaco (LEE *et al.*, 2012).

O aumento da síntese de NO também é desencadeado pelas vias O&NS, desempenhando um papel fundamental na fisiopatologia da inflamação crônica e de processos neurodegenerativos (LIBERATORE *et al.*, 1999). Assim, durante a inflamação há um aumento na produção de NO, gerando produtos como o peroxinitrito, nitrato, dióxido de nitrogênio, os quais induzem diretamente a neurodegeneração (REDFORD *et al.*, 1997). Em nosso protocolo experimental,

detectamos o aumento dos níveis de conteúdo de nitrito, após administração repetida por LPS. Este achado corrobora com um estudo realizado em pacientes com depressão, o qual verificou um aumento significativo dos níveis de nitrito em pacientes deprimidos (SELEK *et al.*, 2008). O aumento dos níveis de nitrito observado nas áreas cerebrais de animais expostos ao LPS pode ser um indicativo da ativação microglial.

Nos animais tratados com doxiciclina e escitalopram, foi verificado uma diminuição dos níveis de nitrito nas áreas cerebrais do hipotálamo e hipocampo. A este respeito, a minociclina, droga da mesma classe da doxiciclina, apresentou propriedades imunomoduladoras, incluindo a atividade antidepressiva (MIYAOKA *et al.*, 2012). Neste sentido, seus efeitos no SNC foram atribuídos à inibição do estresse oxidativo, através da atenuação de NO sintase induzida (iNOS), COX-2 e metaloproteinase (MMP) e regulação na neurotransmissão glutamatérgica (GONZÁLEZ *et al.*, 2007; CHAVES *et al.*, 2009; MONTE *et al.*, 2013; RÉUS *et al.*, 2014). Por outro lado, há também evidências de que antidepressivos visam atenuar a via O&NS, pelo o aumento antioxidantes e diminuição de processos neuroprogressivos (MAES *et al.*, 2012).

- *Reversão das alterações nos níveis pró-inflamatórios induzidas por doxiciclina ou escitalopram.*

O início do processo inflamatório induzido por infecção ou danos teciduais é detectado pelos receptores de reconhecimento de padrões, como receptores *toll-like* (TLR4), reconhecendo o padrão molecular associado a patógeno, LPS. Esses receptores ativam fatores de transcrição, como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), o qual induzirá a produção de citocinas pró-inflamatórias, (HOSHINO *et al.*, 1999; AKIRA & TAKEDA, 2004). Baseado nisso, em nossos resultados, o LPS aumentou a expressão proteica de NF- $\kappa$ B no hipocampo, ativando a via de sinalização pró-inflamatória, pela transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias. Este achado corrobora com estudos anteriores, onde verificou-se que após uma administração de LPS por 7 dias, houve um aumento dos níveis de expressão proteica de NF- $\kappa$ B (GE *et al.*, 2015; ADZIC *et al.*, 2015).

Portanto, a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, via intracelular de sinalização pró-inflamatória, induz produtos citotóxicos que explicam a inflamação e o estresse oxidativo, enquanto a inibição da ativação de NF- $\kappa$ B pode suprimir a expressão de vários genes, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e NO sintase induzida (iNOS) (CSAKI *et al.*, 2009). O tratamento com doxiciclina ou escitalopram não foi capaz de reverter a alteração nos níveis da expressão proteica do NF- $\kappa$ B, mas a combinação dos dois fármacos reduziu os níveis de NF- $\kappa$ B a níveis de controle. Na mesma linha de descobertas, um estudo recente de Santa-Cecilia *et al.*, 2016, mostrou que o pré-tratamento de doxiciclina, inibiu a translocação induzida por LPS da subunidade p65 NF- $\kappa$ B, do citoplasma para o núcleo. Assim, a doxiciclina inibe a ativação de sinalização do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.

A inflamação sistêmica, induzida por LPS, favorece a neuroinflamação e a ativação microglial. Embora a ativação microglial seja necessária para a defesa do organismo, uma ativação elevada da microglia é neurotóxica (MCGEER *et al.*, 2005; POLAZZI & CONTESTABILE, 2002), a qual produz fatores citotóxicos, como superóxido (COLTON & GILBERT, 1987), óxido nítrico (LIU *et al.*, 2002, MOSS & BATES, 2001), citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (KOO & DUMAN, 2009) e TNF $\alpha$  (QIN *et al.*, 2007). Portanto, a microglia ativada é prejudicial aos neurônios, uma vez que pode sobrecarregar as defesas antioxidantes no cérebro, causando dano oxidativo aos lipídios, proteínas e DNA, fenômenos que desempenham um papel fundamental na apoptose das células neuronais.

No presente estudo, a ativação microglial foi associada a níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , na área hipocampal do cérebro e pelo aumento de níveis de expressão proteica do marcador IBA-1. Em consonância com os nossos resultados, um estudo realizado por Katafuchi *et al.*, 2012, verificou um aumento de níveis proteicos de IBA-1, após exposição de LPS por 7 dias. Portanto, administrações repetidas por LPS induzem ativação microglial, porém essa ativação pode ser revertida, após tratamento concomitante ou sozinho de doxiciclina ou escitalopram, conforme verificado em nossos resultados. Na mesma linha de descobertas, um estudo recente realizado por Santa-Cecilia *et al.*, 2016, mostrou que o pré-tratamento com doxiciclina, preveniu o aumento de expressão proteica de IBA-1, após administração de LPS, em cultura primária de células microgliais. Baseado em nossos resultados, foi evidenciado que a doxiciclina pode inibir a

ativação microglial.

A microglia em seu fenótipo M1, tem característica pró-inflamatória, após exposição ao LPS, provocando processo neuroinflamatório, desencadeado pelo aumento de produção dos mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Em nosso estudo, no protocolo 2, evidenciamos o aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Este achado corrobora com um estudo anterior realizado por Ge *et al.*, 2015, que evidenciou o aumento dos níveis de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nas áreas do hipocampo e CPF, após exposição ao LPS durante 7 dias em roedores machos. Outro estudo realizado por Guo *et al.*, 2014, também demonstrou um aumento de citocinas IL-1 $\beta$ , após exposição de LPS por 16 dias, evidenciando um comportamento tipo-depressivo. Nesse sentido, estudos pré-clínicos demonstraram níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  em pacientes que sofrem de depressão maior e que estes níveis estavam fortemente correlacionados com a gravidade da depressão (THOMAS *et al.*, 2005).

Em relação ao pós-tratamento com antimicrobiano e antidepressivo, os níveis de IL-1 $\beta$  foram revertidos após tratamento com doxiciclina. Em relação aos níveis de TNF- $\alpha$ , foram diminuídos após administração concomitante de doxiciclina e escitalopram. De acordo com nossos resultados, um estudo realizado *in vitro*, com células primárias de microglia, mostrou uma diminuição dos níveis de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , após pré-tratamento com doxiciclina (SANTA-CECILIA *et al.*, 2016). Outro estudo realizado por Mello *et al.*, 2013, evidenciou que o pré e pós-tratamento com doxiciclina e imipramina preveniram e reverteram o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ .

Na mesma linha de descobertas, utilizando a tetraciclina minociclina, vários estudos evidenciaram a atividade neuroprotetora da minociclina, através da inibição da ativação da microglia, em reduzir a transcrição da via pró-inflamatória e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (KIM *et al.*, 2004; HENRY *et al.*, 2008; HORVATH *et al.*, 2008). Um estudo realizado por Chung *et al.*, 2010, utilizando antidepressivos, mostrou que a paroxetina possui efeitos anti-inflamatórios no cérebro de camundongos, através da diminuição de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e iNOS, evidenciando uma neuroproteção da microglia. Isto é consistente com os estudos em roedores mostrando que os antidepressivos têm efeitos anti-inflamatórios (XIA *et al.*, 1996; ROUMESTAN *et al.*, 2007).

Considerando as alterações pró-inflamatórias, o bloqueio na produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  é um alvo terapêutico viável para o tratamento da depressão (KOO & DUMAN, 2009). Portanto, pode-se verificar o efeito anti-inflamatório da doxiciclina, resultando na estabilização da microglia, demonstradas por este medicamento na diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e na diminuição dos níveis de expressão proteica IBA-1. Em linha com as descobertas deste estudo, os antidepressivos padrões também estabilizaram as células da microglia, após estimulação do LPS (TYNAN *et al.*, 2012). Estas implicações podem explicar porque a doxiciclina e o escitalopram apresentaram efeitos comportamentais e neuroquímicos similares em nossas condições experimentais.

- *Reversão de sinalizações protetoras induzidas por doxiciclina ou escitalopram.*

A via de sinalização MEK/ERK medeia a transdução de estímulos intracelulares e expressão gênica, regulando uma variedade de atividades celulares, como proliferação, migração e diferenciação celular (CHENG *et al.*, 2013). Em nossos resultados, foi verificado que o LPS diminuiu os níveis de expressão proteica da ERK1/2, enquanto que a doxiciclina reverteu esses níveis. Portanto, a inibição da cascata MEK/ERK induziu um comportamento tipo-depressivo nos animais, pela redução da fosforilação de ERK 1/2 (DUMAN *et al.*, 2007; REUS *et al.*, 2014). Nessa mesma linha de descobertas, estudos demonstraram o envolvimento desta via de sinalização em depressão maior e em modelos de animais semelhantes à depressão, induzidos por estresse crônico ou corticosterona, evidenciando níveis reduzidos de ERK1/2 nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal e hipocampo desses roedores (GOURLEY *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2014). Essa via também está envolvida como alvo potencial para a terapia de depressão (REUS *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015). Portanto, o aumento de expressão proteica de fosfoERK 1/2 estaria ligada ao efeito neuroprotetor da doxiciclina, como antidepressivo. Além disso, a proteína ERK ativada pode regular a transcrição do fator CREB, o qual medeia a transcrição de seus genes alvo, como o BDNF (GUAN *et al.*, 2013),

Outra via também relacionada com o mecanismo inflamatório desencadeado por exposição ao LPS, é a da glicogênio sintase quinase-3 (GSK3 $\beta$ ), identificado

como um regulador dos processos inflamatórios inatos, os quais promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e influencia a ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B e CREB (MARTIN *et al.*, 2005). Há várias evidências sugerindo que a via PI3K/AKT desempenha um papel regulador negativo na inflamação desencadeada por TLR, particularmente em caminhos dependentes de MyD88 como p38, JNK e NF- $\kappa$ B (KIM *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002; GUHA *et al.*, 2002; AKSOY *et al.*, 2005). No presente estudo, identificamos a diminuição de expressão proteica de GSK-3 $\beta$  fosforilada, após exposição ao LPS. Em consonância com nossos resultados, um estudo realizado por Martin *et al.*, 2005, observou a inibição da fosforilação de GSK-3 $\beta$ , através da ativação da via PI3K-AKT, após exposição de LPS de *E. Coli*, em culturas de células de monócitos humanos.

No pós-tratamento realizado com antimicrobiano e antidepressivo, demonstramos o aumento de expressão proteica de GSK-3 $\beta$  fosforilada, após administração concomitante de doxiciclina e escitalopram, comparado ao grupo do LPS. Este achado evidenciou que essas duas drogas agiram como inibidores da GSK-3 $\beta$  fosforilada, demonstrando que esta inibição promove a supressão de produção de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que aumenta a produção de anti-inflamatórias, por exemplo a IL-10, em resposta a múltiplas vias de sinalização de receptores *toll-like*, atenuando a neuroinflamação. Nessa mesma linha de descobertas, um estudo realizado anteriormente, verificou que antidepressivos, como fluoxetina e imipramina aumentaram a fosforilação inibitória de GSK-3 $\beta$  em áreas cerebrais de roedores (LI *et al.*, 2004). Por outro lado, o tratamento com inibidores de GSK-3 $\beta$  atenuou significativamente a produção de NO e iNOS, induzida por LPS, em células microgliais murinas e culturas primárias de microglia (HUANG *et al.*, 2009). Portanto, devido à capacidade de GSK3 $\beta$  em modular uma resposta inflamatória, após a ativação de TLR, esta serve como alvo terapêutico contra doenças neurodegenerativas, como é o caso da depressão.

Em nossos resultados, verificamos que após exposição repetida por LPS, houve a diminuição de expressão proteica de CREB fosforilada, porém essa diminuição não foi significativa. Nessa mesma linha de descobertas, um estudo realizado por Ge *et al.*, 2015, demonstrou níveis diminuídos de CREB fosforilada, nas áreas do córtex pré-frontal e hipocampo de roedores, após administração de

LPS por 7 dias. Outro estudo recente, demonstrou que os comportamentos semelhantes a depressão foram associados às reduções de expressão proteica de CREB e fosfoCREB no hipocampo (ZHANG *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Ren *et al.*, 2011, envolvendo humanos, verificou uma diminuição da expressão proteica de CREB no cérebro de vítimas deprimidas suicidas. Portanto, o fator de transcrição CREB desempenha um papel importante na fisiologia e patologia da depressão (THOME *et al.*, 2002) e no tratamento com antidepressivos (D'SA & DUMAN, 2002).

No tratamento com o antimicrobiano e o antidepressivo, verificamos que a doxiciclina aumentou os níveis de expressão do fator transcripcional CREB fosforilado. Esse achado evidencia a ação neuroprotetora do antimicrobiano, visto que o aumento de CREB fosforilado, irá levar a transcrição de vários genes neurotróficos incluindo BDNF (SHAYWITZ & GREENBERG, 1999), de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (GE *et al.*, 2015). Essa ação neuroprotetora também é verificada na ação de antidepressivos, como evidenciado em estudo anterior por Thome *et al.*, 2000, após administração de antidepressivos, como fluoxetina ou tranilcipromina, durante 14 dias, demonstrou o aumento da expressão proteica de CREB fosforilado em áreas cerebrais de roedores e conseqüentemente, sua função neuroprotetora.

De acordo com os nossos resultados, vimos que a exposição repetida ao LPS causou alterações em vias intracelulares relacionadas a mecanismos pró-inflamatórios, bem como ativação da microglia, pela expressão aumentada de níveis proteicos do marcador IBA-1. Também verificamos que ocorreu um aumento de expressão proteica nos níveis de NF- $\kappa$ B, evidenciando a ativação dessa via pró-inflamatória na transcrição de genes alvos, como citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Foi observado que o tratamento proposto pelo presente estudo, com doxiciclina e escitalopram em associação evidenciou a reversão destes mecanismos pró-inflamatórios. Além disso, a doxiciclina aumentou os níveis proteicos de ERK 1/2 total, os níveis de glutathiona reduzida e os níveis de CREB fosforilado, evidenciando seu feito neuroprotetor. Portanto, sugere-se que a doxiciclina possa atuar como um antidepressivo no tratamento para as alterações semelhantes à depressão.

## 8 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram a influência do sexo nas alterações comportamentais e neuroinflamatórias/oxidativas no modelo de animal de depressão induzido por desafio imune por LPS, com fêmeas apresentando anedonia e ansiedade, enquanto machos apresentaram anedonia associada a imobilidade no nado forçado, mostrando uma incapacidade de responder de forma adequada a eventos estressores.

Nossos resultados também indicaram que a administração combinada de escitalopram e doxiciclina foi capaz de reverter alterações tipo-depressão induzidas pela exposição repetida ao LPS, bem como foi capaz de ativar vias intracelulares neuroprotetoras de forma distinta de sua administração isolada. Uma vez que a doxiciclina é um antimicrobiano amplamente utilizado, com um perfil de segurança favorável, nossos dados fornecem evidências para o desenho de ensaios clínicos para o tratamento do transtorno depressivo maior utilizando este fármaco como terapia adjuvante, principalmente nos casos de depressão associada a translocação bacteriana com aumento de LPS sanguíneo.

## REFERÊNCIAS

ABBASI SH, HOSSEINI F, MODABBERNIA A, ASHRAFI M, AKHONDZADEH S. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. **Journal of Affective Disorders**.141:308-14, 2012.

ABEL T, NGUYEN PV, MARAD M, DEUEL TAS, KANDEL ER, BOURTCHOULADZE R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. **Cell** 88:615–626, 1997.

ABRAHAM, J.; JANG, S.; GODBOUT, J. P.; CHEN, J. KELLEY, K. W.; JOHNSON, R. W. Aging sensitizes mice to behavioral deficits induced by central HIV-1 gp120. **Neurobiol. Aging**, v. 29, p. 614-621, 2006.

ADZIC M; DJORDJEVIC, J; MITIC, M; BRKIC, Z; LUKIC, I; RADOJCIC, M. 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** 291, 130–139, 2015.

AFIFI, M. Gender differences in mental health **Singapore Med. J.**, 48, 385-391, 2007.

AGUIAR, C. C.; CASTRO, T. R.; CARVALHO, A. F.; VALE, O. C.; SOUSA, F. C.; VASCONCELOS, S. M. Drogas antidepressivas. **Acta Med. Port.**, v. 24, n. 1, p. 091-098, 2011.

AHMED, A.I.A., VAN DER HEIJDEN, F.M.M.A., VAN DEN BERKMORTEL, H., KRAMERS, K. A man who wanted to commit suicide by hanging himself: an adverse effect of ciprofloxacin. **Gen. Hosp. Psychiatry**, 2011.

AKIRA, S, TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol** 4:499–511, 2004.

AKIRA, S., UEMATSU, S. AND TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, 124, 783-801, 2006.

AKSOY, E., W. VANDEN BERGHE, S. DETIENNE, Z. AMRAOUI, K. A. FITZGERALD, G. HAEGEMAN, M. GOLDMAN, AND F. WILLEMS. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and IFN-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. **Eur. J. Immunol.** 35: 2200–2209, 2005.

AL-ASMARI AK, KHAN MW. Inflammation and schizophrenia: alterations in cytokine levels and perturbation in antioxidative defense systems. **Hum Exp Toxicol** 33:115–22, 2014.

ALBONI, S; POGGINI, S; GAROFALO, S; MILIOR, G; EL HAJJ, H; LECOURS, C; GIRARD, I; GAGNON, S; BOISJOLY-VILLENEUVE, S; BRUNELLO, N; WOLFER, DP; LIMATOLA, C; TREMBLAY, M; MAGGI, L; BRANCHI, I. Fluoxetine treatment affects the inflammatory response and microglial function according to the quality of the living environment. **Brain, Behavior, and Immunity** 58. 261–271, 2016.

ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J Endotoxin Res.**, 7:167-203, 2002.

AMBADE, A; MANDREKAR, P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease, **International Journal of Hepatology**, vol. 2012, Article ID 853175, 9 pages, 2012.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5. 5th.ed. Washington: **American Psychiatric Association**, 2013.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, p.103-108, 1996.

ANDERSON, K.U. Toll signaling pathways in the innate response. **Curr Opin Immunol.**, 12:13-19, 2000.

ANDERSON, MT; STAAL, FJT; GITLER, C; HERZENBERG, LA; HERZENBERG, LA. Separation of oxidant-initiated and redox- regulated steps in the NF- $\kappa$ B signal transduction pathway, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 91, no. 24, pp. 11527–11531, 1994.

ANDERSSON, H.; ALESTIG, K. The penetration of doxycycline into CSF. **Scand J. Infect. Dis. Suppl.**, v. 9, p. 17–19, 1976.

ANDERSSON, J.; NAGY, S.; BJORK, L.; ABRAMS, J.; HOLM, S.; ANDERSSON, U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. **Immunol Rev.**,127:69-96, 1992.

ANDREAZZA, A.C.; FREY, B.N.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; ROMBALDI, F.; SANTIN, A.; GONCALVES, C.A.; KAPCZINSKI, F. DNA damage in bipolar disorder. **Psychiatry Res.**, v. 153, n. 1, p. 27–32, 2007.

ANFORTH, H.R; BLUTHE, RM; BRISTOW, A; HOPKINS, S; LENCZOWSKI, MJ; LUHESHI, G; LUNDKVIST, J; MICHAUD, B; MISTRY, Y; VAN DAM, AM; ZHEN, C; DANTZER, R; POOLE, S; ROTHWELL, NJ; TILDERS, FJ; WOLLMAN, EE. Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1 $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$ . **Eur. Cytokine Netw.** 9, 279–288, 1998.

ANGELUCCI, F.; BRENE, S.; MATHE, A.A. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. **Mol. Psychiatry**, v. 10, n. 4, p. 345–352, 2005.

ANISMAN, H.; HAYLEY, S.; TURRIN, N.; MERALI, Z. Cytokines as a stressor: Implications for depressive illness. **Intl. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 5, p. 357–373, 2002.

ANISMAN, H.; MERALI, Z. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. **Adv. Exptl Med. Biol.** 461:199–233, 1999.

ANLAR B, SENBIL N, GUVEN A. Doxycycline in autoimmune central nervous system disorders in children: an in vitro study. **Turkish Journal of Pediatrics.** 49: 274-7, 2007.

ARAI, K.Y., ROBY, K.F., TERRANOVA, P.F. Tumor necrosis factor alpha (TNF) suppresses cAMP response element (CRE) activity and nuclear CRE binding protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. **Endocrine** 27, 17–24, 2005.

ARAKAWA S, SHIRAYAMA Y, FUJITA Y, ISHIMA T, HORIO M, MUNEOKA K, IYO M, HASHIMOTO K. Minocycline produced antidepressant-like effects on the learned helplessness rats with alterations in levels of monoamine in the amygdala and no changes in BDNF levels in the hippocampus at baseline. **Pharmacol Biochem Behav.** 100:601–6, 2012.

ARANTES-GONCALVES F, COELHO R. Depression and treatment. Apoptosis, neuroplasticity and antidepressants. **Acta Med Port.** 19(1):9–20, 2006.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205 – 235, 1973.

AUDET, MC, JACOBSON-PICK, S, WANN, BP, ANISMAN, H Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. **Brain Behav. Immun.** 25, 1197-1205, 2011.

AUTRY AE, MONTEGGIA LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacol Rev.** 64(2):238–58, 2012.

AVITSUR R, YIRMIYA R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacol Biochem Behav.** 64:787–796, 1999.

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. **Prog. Neuropsychopharmacol. Bol. Psychiatry**, 29, 261–265, 2005.

AZEVEDO, R.B., LACAVALA, Z.G., MIYASAKA, C.K., CHAVES, S.B., CURI, R. Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34, 683–687, 2001.

BADALÀ, F., NOURI-MAHDAVI, K., RAOOF, D.A. Intranasal Immune Challenge Induces Sex-Dependent Depressive-Like Behavior and Cytokine Expression in the Brain Leonardo. **Neuropsychopharmacology** 144, 724–732, 2008.

BAEUEERLE, PA, BALTIMORE D. NF- $\kappa$ B: Ten years after. **Cell.** 87:13-20, 1996.

BALDESSARINI, R.J. Drug Therapy of Depression and Anxiety Disorders. In: Laurence L. Brunton, editor. Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Eleventh Ed 2006.

BALDWIN, ASJ. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. **Annu Rev Immunol**. 14:649-83, 1996.

BALE, TL, VALE, WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. 44, 525-557, 2004.

BARNA, M., KOMATSU, T., BI, Z., REISS, C.S. Sex differences in susceptibility to viral infection of the central nervous system. **J. Neuroimmunol**. 67, 31–9, 1996.

BARRIENTOS, R. M.; HIGGINS, E. A.; BIEDENKAPP, J. C.; SPRUNGER, D. B.; WRIGHT-HARDESTY, K. J.; WATKINS, L. R.; RUDY, J. W.; MAIER, S. F. Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. **Neurobiol. Aging**, v. 27, n. 5, p. 723-732, 2006.

BEAULIEU J-M, GAINETDINOV RR, CARON MG. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**; 49:327–347, 2009.

BEBBINGTON, PE. Sex and depression. **Psychol Med** 28(01):1–8, 1998.

BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*, 65, 1865–1874, 1999.

BERK, M; NG F, DEAN O, DODD S, BUSH AI. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p. 346–351, 2008.

BERTON, O., NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci**. 7, 137–151, 2006.

BESEDOVSKY, H. O.; REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, p. 652–654, 1986.

BEUREL, E. Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases. **Front Mol Neurosci** 4:18, 2011.

BEUREL, E., MICHALEK, S.M., JOPE, R.S. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). **Trends Immunol**. 31, 24-31, 2010.

BEUTLER, B. Sepsis and evolution of the innate immune response. **Crit Care Med.**, 29:S2-S7, 2001.

BIESMANS S, BOUWKNECHT JA, VER DONCK L, LANGLOIS X, ACTON PD, DE HAES P, DAVOODI N, MEERT TF, HELTINGS N, NUYDENS R. Peripheral administration of tumor necrosis factor- $\alpha$  induces neuroinflammation and

sickness but not depressive-like behavior in mice. **Biomed. Res. Int.** 2015:716920, 2015.

BILBO SD, BARRIENTOS RM, EADS AS, NORTHCUTT A, WATKINS LR, RUDY JW, MAIER, SF. Early-life infection leads to altered BDNF and IL-1 mRNA expression in rat hippocampus following learning in adulthood. **Brain Behav Immun.**, 22:451–5, 2008.

BILICI, M, EFE, H, KÖROGLU, MA, UYDU, HA, BEKAROGLU, M, DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J. Affect. Disord.** 64 (1), 43–51, 2001.

BISWAS SK, LOPEZ-COLLAZO E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trend Immunol.** 30:475–89, 2009.

BISWAS, EB; PEIXOTO, EB; SOUZA, DS; LOPES DE FARIA, JB. Hypertension increases pro-oxidant generation and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes. **American Journal of Nephrology**, vol. 28, no. 1, pp. 133–142, 2008.

BISWAS, SK; LOPES DE FARIA, JB. Hypertension induces oxidative stress but not macrophage infiltration in the kidney in the early stage of experimental diabetes mellitus. **American Journal of Nephrology**, vol. 26, no. 5, pp. 415–422, 2006.

BISWAS, SK; LOPES DE FARIA, JB. Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? **Free Radical Research**, vol. 41, no. 2, pp. 216–224, 2007.

BLENDY, J.A. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. **Biol. Psychiatry.** 59, 1144–1150, 2006.

BLOCK M. L., ZECCA L., HONG J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat. Rev. Neurosci.** 8, 57–69, 2007.

BLUTHE, RM. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. The first demonstration that section of the vagus nerves blocks immune-to-brain communication and abrogates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour without compromising the peripheral immune response. **CR Acad. Sci.** III, v. 317, p. 499–503, 1994.

BODE, C; DIEDRICH, B; MUENSTER, S; HENTSCHEL, V; WEISHEIT, C; ROMMELSHEIM, K; HOEFT, A; MEYER, R; BOEHM, O; KNUEFERMANN, P; BAUMGARTEN, G. Antibiotics regulate the immune response in both presence and absence of lipopolysaccharide through modulation of Toll-like receptors, cytokine production and phagocytosis in vitro. **International Immunopharmacology.** 18, 27–34, 2014.

BOGDANOVA, OV; KANEKAR, S; D'ANCI, KE; RENSHAW, PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiol. Behav.**, 118, pp. 227–239, 2013.

BONNIE, E, LONZE, GINTY, DD. Function and Regulation of CREB Family

Transcription Factors in the Nervous System. **Neuron**.35:605–23, 2002.

BOUAYED, J., RAMMAL, H; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2, 63–67, 2009.

BOUAYED, J., RAMMAL, H., SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. **Oxidative Med. Cell. Longevity** 2 (2), 63–67, 2009b.

BOUAYED, J., RAMMAL, H., YOUNOS, C., SOULIMANI, R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 564, 146–149, 2007b.

BOULANGER, LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. **Neuron.**, 64:93-109, 2009.

BOUMAN, A, HEINEMAN, MJ, FAAS, MM. Sex hormones and the immune response in humans. **Hum Reprod Update.**11:411–423, 2005.

BRADLEY, PP; CHRISTENSEN, RD; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.** Sep;60(3):618-22, 1982.

BRESLAU, N. Gender differences in trauma and posttraumatic stress disorder. *J. Gender Specif. Med. JGSM Off. J. Partnersh.* **Women's Health Columbia.** 5:34–40, 2002.

BROWN, E.S.; WOOLSTON, D.; FROL, A.; BOBADILLA, L.; KHAN, D.A.; HANCZYC, M.; RUSH, A.J.; FLECKENSTEIN, J.; BABCOCK, E.; CULLUM, C.M. Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving corticosteroid therapy. **Biol. Psychiatry**, v. 55, n. 5, p. 538–545, 2004.

BRUMMELTE S., MC GLANAGHY E., BONNIN A., OBERLANDER T. F. Developmental changes in serotonin signaling: implications for early brain function, behavior and adaptation. **Neuroscience.** 342:212–231, 2017.

BRUNONI, A.R., LOPES, M, FREGNI, F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, 11, 1169-1180, 2008.

BRUSTOLIM D, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, KAST RE, ALTSCHULER EL, SOARES MB. A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: the antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in mice. **Int Immunopharmacol** 6(6):903–907, 2006.

BUFFO, A, ROLANDO, C, CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol.** 79:77–89, 2010.

BUNNEY, WE, DAVIS, JM. Norepinephrine in depressive reactions. **Arch. Gen. Psychiatry.** 13, 1965.

BURKE WJ, GERGEL I, BOSE A. Fixed-dose trial of the single isomer SSRI escitalopram in depressed outpatients. **J Clin Psychiatry** 2002;63:331–6, 2002.

CACHOFEIRO, V; GOICOCHEA, M; GARCIA DE VINUESA, S; OUBINA, P; LAHERA, V; LUNO, J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease, **Kidney International**, vol. 74, pp. S4–S9, 2008.

CACILHAS, AA, MAGALHAES, PVD, CERESER, KM, WALZ, JC, WEYNE, F, ROSA, AR, VIETA, E, KAPCZINSKI, F. Bipolar disorder and age-related functional impairment. **Revista Brasileira De Psiquiatria**. 31:354-7, 2009.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, 6, 391–397, 1997.

CADENAS, E., SIES, H. The lag phase. **Free. Radic. Res.**, 28, 601–609, 1998.

CAI, K.C., MIL, S. VAN, MURRAY, E., MALLET, J.-F., MATAR, C., ISMAIL, N. Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. **Brain. Behav. Immun.** 58, 327–337, 2016.

CALOGERO, AE, BERNARDINI, R, GOLD, PW, CHROUSOS, GP. Regulation of rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro: potential clinical implications. **Adv. Exp. Med. Biol.** 245, 167-181, 1988.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. **Curr. Opin. Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 25–33, 2006.

CARR, A., MCCALL, M. R., FREI, B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. **Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.**, 20, 1716–1723, 2000.

CARVALHO, LA, TORRE, JP, PAPADOPOULOS, AS, POON, L, JURUENA, MF, MARKOPOULOU, K, CLEARE, AJ, PARIANTE, CM. Lack of clinical therapeutic benefit of antidepressants is associated overall activation of the inflammatory system. **J Affect Disord** ,148:136–140, 2013.

CASTANEDA, A.E.; TUULIO-HENRIKSSON, A.; MARTTUNEN, M.; SUVISAARI, J.; LONNQVIST, J. A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults. **J. Affect. Disord.**, v. 106, p. 1–27, 2008.

CASTRÉN E, VOIKAR V, RANTAMAKI T. Role of neurotrophic factors in depression. **Curr Opin Pharmacol.** (1):18-21, 2007.

CHABY, R. Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. **DDT.**, 4:209-221, 1999.

CHAVES, C., MARQUE, C.R., TRZESNIAK, C., MACHADO DE SOUSA, J.P., ZUARDI, A.W., CRIPPA, J.A.S., DURSUN, S.M., HALLAK, J.E. Glutamate-N-methyl-

D-aspartate receptor modulation and minocycline for the treatment of patients with schizophrenia: an update. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.* 42, 1002–1014, 2009.

CHEN R, ZHOU H, BELTRAN J, MALELLARI L, CHANG SL. Differential expression of cytokines in the brain and serum during endotoxin tolerance. *J Neuroimmunol.* 163(1–2):53–72, 2005.

CHEN YH, ZHANG RG, XUE F, WANG HN, CHEN YC, HU GT, PENG Y, PENG ZW, TAN QR. Quetiapine and repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorate depression-like behaviors and up-regulate the proliferation of hippocampal-derived neural stem cells in a rat model of depression: the involvement of the BDNF/ERK signal pathway. *Pharmacol Biochem Behav.* 136:39–46, 2015.

CHEN, J.; BUCHANAN, J. B.; SPARKMAN, N. L.; GODBOUT, J. P.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav. Immun.*, v. 22, n. 3, p. 301-311, 2008.

CHEN, YH; ZHANG, RG; XUE F; WANG, HN; CHEN, YC; HU, GT; PENG, Y; PENG, ZW; TAN, QR. Quetiapine and repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorate depression-like behaviors and up-regulate the proliferation of hippocampal-derived neural stem cells in a rat model of depression: The involvement of the BDNF/ERK signal pathway. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 136, 39–46, 2015.

CHENG P, ALBERTS I, LI X. The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. *Int J Dev Neurosci.* 31(8):783–789, 2013.

CHING, S.; ZHANG, H.; BELEVYCH, N.; LAI, W.; JAEGER, L.B, CHEN, Q; QUAN, N. Endothelial-specific knockdown of interleukin-1 (IL-1) type 1 receptor differentially alters CNS responses to IL-1 depending on its route of administration. *J. Neurosci.*, v. 27, n. 39, p. 10476-10486, 2007.

CHO, Y, SON, HJ, KIM, EM, CHOI, JH, KIM, ST, JI, IJ, CHOI, DH, JOH, TH, KIM, YS, HWANG, O. Doxycycline is neuroprotective against nigral dopaminergic degeneration by a dual mechanism involving MMP-3. *Neurotoxicity Research.* 16:361-71, 2009.

CHUNG, ES, CHUNG, YC, BOK, E, BAIK, HH, PARK, ES, PARK, JY, YOON, SH, JIN, BK. Fluoxetine prevents LPS-induced degeneration of nigral dopaminergic neurons by inhibiting microglia-mediated oxidative stress. *Brain Research.* 1363:143-50, 2010.

CHUNG, Y.C., KIM, S.R., JIN, B.K. Paroxetine prevents loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting brain inflammation and oxidative stress in an experimental model of Parkinson's disease. *J. Immunol.* 185 (2), 1230– 1237, 2010.

CLARK WM, LESSOV N, LAUTEN JD, HAZEL K. Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Mol Neurosci* 9:103–108, 1997.

CLARK, W.M.; CALCAGNO, F.A.; GABLER, W.L.; SMITH, J.R., COULL, B.M. Reduction of central nervous system reperfusion injury in rabbits using doxycycline treatment. **Stroke**, v. 25, p. 1411–1415, 1994.

CLAYTON, PJ; GROVE, WM; CORYELL, W; KELLER, M; HIRSCHFELD, R; FAWCETT, J. Follow-up and family study of anxious depression. **Am. J. Psychiatry**, 148, 1512-1517, 1991.

COLTON CA, GILBERT DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. **FEBS Lett.**; 223:284–288, 1987.

COLTON, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **J. Neuroimmune Pharmacol.** 4, 399–418, 2009.

COLTON, C., WILCOCK, D. M. Assessing activation states in microglia. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets** 9, 174–191, 2010.

COMBRINCK, M. I.; PERRY, V. H.; CUNNINGHAM, C. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 7 –11, 2002.

CONNOR, TJ, LEONARD BE. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. **Life Sci.** 62:583–606, 1998.

CONTRERAS CM, MARTINEZ-MOTA L, SAAVEDRA M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; 22:1121–1128, 1998.

COPPEN A:. Indoleamines and affective disorders. **J Psychiatr Res.** 9(3):163-171, 1972.

CORTES-VIEYRA, R., BRAVO-PATINO, A., VALDEZ-ALARCON, J.J., JUAREZ, M.C., FINLAY, B.B., BAIZABAL-AGUIRRE, V.M. Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. **J. Inflamm. Lond. Engl.** 9, 23, 2012.

CRYAN JF, HOLMES A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nat Rev Drug Discov.** 4:775–790, 2005.

CSAKI, C., MOBASHERI, A., SHAKIBAEI, M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and apoptosis. **Arthritis Res. Ther.** 11, R165, 2009.

CUNHA, A.B., FREY, B.N., ANDREAZZA, A.C., GOI, J.D., ROSA, A.R., GONCALVES, C.A., SANTIN, A., KAPCZINSKI, F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. **Neurosci. Lett.** 398, 215–219, 2006.

CUNHA, BA. Minocycline Versus Doxycycline in the Treatment of Lyme Neuroborreliosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 237-238, 2000.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory. **Front. Mol. Neurosci.**, v. 3, p. 1, 2010.

CUNNINGHAM, C, SANDERSON, DJ. Malaise in the water maze: untangling the effects of LPS and IL-1 on learning and memory. **Brain Behav Immun.** 22:1117–27, 2008.

CUNNINGHAM, C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. **Glia.** 61:71–90, 2013.

CUSTODIO, C S, MELLO, B S, CORDEIRO, R C, DE ARAUJO, F Y, CHAVES, J H, VASCONCELOS SM, MACEDO, D S. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **European Journal of Pharmacology**, 9. 00346-00344, 2013.

D'AGOSTINO, P.; LA ROSA, M.; BARBERA, C.; ARCOLEO, F.; DI BELLA, G.; MILANO, S.; CILLARI, E. Doxycycline reduces mortality to lethal endotoxemia by reducing nitric oxide synthesis via an interleukin-10-independent mechanism. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 2, p. 489-492, 1998.

D'SA C, DUMAN RS. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord.** 4(3):183–94, 2002.

DALLA, C, PITYCHOUTIS, PM, KOKRAS, N, PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 106, 226–233, 2010.

DALLA, C., PITYCHOUTIS, P.M., KOKRAS, N., PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 106, 226–233, 2010.

DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D., & MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, 52, 601–623, 2006.

DANIELE, S; DA POZZO, E; ZAPPELI, E; MARTINI, C. Trazodone treatment protects neuronal-like cells from inflammatory insult by inhibiting NF-κB, p38 and JNK. **Cellular Signalling.** 27,1609–1629, 2015.

DANTZER R, O'CONNOR JC, FREUND GG, JOHNSON RW, KELLEY KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience.** 9:46-56, 2008.

DANTZER, R, WOLLMAN E, VITKOVIC L, YIRMIYA R. Cytokines and depression: fortuitous or causative association? **Mol. Psychiatry** 4, 328–332, 1999.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 933, p. 222–234, 2001.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand. **Brain Behav Immun.**15:7–24, 2001.

DARNALL, B.D., SUAREZ, E.C. Sex and gender in psychoneuroimmunology research: past, present and future. **Brain. Behav. Immun.** 23, 595–604, 2009.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. DUSTIN, M. L.; GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat. Neurosci.**, v. 8, n. 6, p. 752-758, 2005.

DE GRAAF, R; BIJL, RV; SPIJKER, J; BEEKMAN, AT; VOLLEBERGH, WA. Temporal sequencing of lifetime mood disorders in relation to comorbid anxiety and substance use disorders – findings from the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study Soc. **Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.**, 38; 1-11, 2003.

DE KLOET ER, JOELS M, HOLSBOER F. Stress and Brain: From adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci.**; 6: 463-475, 2005.

DE KLOET, E R. VREUGDENHIL E.; OITZL M. S.; JOELS M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr. Rev.**, v. 19, p. 269-301, 1998.

DE LEÓN-NAVA, MA; MORALES-MONTOR,J. Immune sexual dimorphism: can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile? **Rev. Invest. Clin.** 58; 161–169, 2006.

DEAKIN, JFW, GUIMARÃES, FS, WANG, M. & HENSMAN, R. Experimental tests of the 5HT receptor imbalance theory of affective disturbance, **MRC Neuropsychiatry.** 1991.

DELLAGIOIA N, DEVINE L, PITTMAN B, HANNESTAD J. Bupropion pre-treatment of endotoxin-induced depressive symptoms. **Brain Behav Immun** 31:197–204, 2013.

DHALLA, N. S., TEMSAH, R. M., NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J. Hypertens.**, 18, 655–673, 2000.

DIAMOND M, KELLY JP, CONNOR TJ. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. **Eur Neuropsychopharmacol.**16:481–90, 2006.

DIKALOV, S. I., VITEK, M. P., & MASON, R. P. Cupric-amyloid beta peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical. **Free Radic. Biol. Med.**, 36, 340–347, 2004.

DOMERCQ M, MATUTE C. Neuroprotection by tetracyclines. **Trends in Pharmacological Sciences.** 25:609-12, 2004.

DONG, C; ZHANG, JC; YAO, W; REN, Q; YANG, C; M,M; HAN, M; SAITO, R; HASHIMOTO, K. Effects of escitalopram, R-citalopram, and reboxetine on serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, and depression-like behavior in mice

after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Volume 144, pages 7-12, 2016.

DOWLATI, Y, HERRMANN, N, SWARDFAGER, W, LIU, H, SHAM, L, REIM, EK, LANCTOT, KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**. 67:446–57, 2010.

DRAPER, HH; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**. Volume 186, Pages 421–431, 1990.

DREVETS WC, PRICE JL, FUREY ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Structure and Function**; 213:93-118, 2008.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, 82, 47–95, 2002.

DUMAN CH, SCHLESINGER L, KODAMA M, RUSSELL DS, DUMAN RS (2007) A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry**. 61(5): 661–670.

DUMAN RS, HENINGER GR, NESTLER EJ. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry** 54:597–606, 1997.

DUMAN RS, MONTEGGIA LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**. 59:1116–1127, 2006.

DUNLOP B. W., NEMEROFF C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Archives of General Psychiatry**, 64(3):327–337, 2007.

DUNN, A.J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin. Neurosci. Res**. 6, 52–68, 2006.

DUNN, A.J., SWIERGIEL, A.H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 688–693, 2005.

DUNN, AJ, SWIERGIEL, AH, BEAUREPAIRE, RD. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 29:891-909, 2005.

DUNN, AJ. Cytokine activation of the HPA axis. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 917, p. 608–617, 2000.

DUNN, AJ. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 261, 964–969, 1992.

DUNN, AJ. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. **Life Sci.** 43:429–435, 1988.

DURK, T; PANTHER, E.; MULLER, T; SORICHTER, S; FERRARI, D; PIZZIRANI, C; DI VIRGILIO F, MYRTEK D, NORGAUER J, IDZKO M. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. **Int Immunol**, 17, pp. 599-606, 2005.

DUVAL, E.R., JAVANBAKHT, A., LIBERZON, I. Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. **Ther. Clin. Risk Manag.** 11, 115–26, 2015.

DWIVEDI, Y., RIZAVI, H.S., ROBERTS, R.C., CONLEY, R.C., TAMMINGA, C.A., PANDEY, G.N. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **J. Neurochem.** 77, 916–928, 2001.

DWORKIN S, MALATERRE J, HOLLANDE F, DARCY PK, RAMSAY RG, MANTAMADIOTIS T. CAMP response element binding protein is required for mouse neural progenitor cell survival and expansion. **Stem Cells** 27:1347–1357, 2009.

EINAT H, YUAN P, GOULD TD, LI J, DU J, ZHANG L, MANJI HK, CHEN G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. **J Neurosci Off J Soc Neurosci.** 23(19):7311–6, 2003.

ENGELAND, CG, KAVALIERS, M, OSSENKOPP, KP. Influence of the estrous cycle on tolerance development to LPS-induced sickness behaviors in rats. **Psychoneuroendocrinology.** 31:510–525, 2006.

ENGELAND, CG, KAVALIERS, M, OSSENKOPP, KP. Sex differences in the effects of muramyl dipeptide and lipopolysaccharide on locomotor activity and the development of behavioral tolerance in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 74:433–447, 2003.

ENGELAND, CG, NIELSEN, DV, KAVALIERS, M, OSSENKOPP, KP. Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. **Physiol Behav.** 72(4):481–91, 2001.

EVANS, D. L.; CHARNEY, D. S.; LEWIS, L. GOLDEN, R.N.; GORMAN, J.M.; KRISHNAN, K. R.; NEMEROFF, C. B.; BREMNER, J. D.; CARNEY, R. M. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. **Biol. Psychiatry**, v. 58, n. 3, p. 175-189, 2005.

EYRE, H.A., PAPPS, E., BAUNE, B.T. Treating depression and depression-like behavior with physical activity: an immune perspective. **Front Psychiatry** 4, 3, 2013.

FAN LW, PANG Y, LIN S, RHODES PG, CAI Z. Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. **Neuroscience.** 133:159–168, 2005.

FELGER, JC; LOTRICH, FE. Inflammatory Cytokines in Depression: Neurobiological Mechanisms and Therapeutic Implications. **Neuroscience**. 29; 246: 199–229, 2013.

FILIPPIN, LI; VERCELINO, R; MARRONI, NP; XAVIER, RM. Redox influence on the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Rev. Bras. Reumatol.** vol.48 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2008.

FINBERG J. P. M. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. **Pharmacology and Therapeutics**.;143(2):133–152, 2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239, 2000.

FIRST M, GIL-AD I, TALER M, TARASENKO I, NOVAK N, WEIZMAN A. The effects of fluoxetine treatment in a chronic mild stress rat model on depression-related behavior, brain neurotrophins and ERK expression. **J Mol Neurosci**. 45(2):246–255, 2011.

FLATOW J, BUCKLEY P, MILLER BJ. Meta-Analysis of Oxidative Stress in Schizophrenia. **Biol Psychiatry**. May 15, 2013.

FLOHE, L; BRIGELIUS-FLOHE , R; SALIOU, C; TRABER, MG; PACKER, L. Redox regulation of NF- $\kappa$ B activation, **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 22, no. 6, pp. 1115–1126, 1997.

FOWLER J. S., LOGAN J., SHUMAY E., ALIA-KLEIN N., WANG G.-J., VOLKOW N. D. Monoamine oxidase: radiotracer chemistry and human studies. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals** ; 58(3):51–64, 2015.

FRANCO, R, FERNANDEZ-SUAREZ, D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. **Prog. Neurobiol.**131, 65-86, 2015.

FRANKLIN, AE, ENGELAND, CG, KAVALIERS, M, OSSENKOPP, KP. Lipopolysaccharide-induced hypoactivity and behavioral tolerance development are modulated by the light–dark cycle in male and female rats. **Psychopharmacology (Berl)**. 170(4):399–408, 2003.

FRENOIS F, MOREAU M, O'CONNOR J, LAWSON M, MICON C, LESTAGE J, KELLEY, KW, DANTZER, R, CASTANON, N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**. 32:516-312, 2007.

FU, X., ZUNICH, S.M., O'CONNOR, J.C., KAVELAARS, A., DANTZER, R., KELLEY, K.W. Central administration of lipopolysaccharide induces depressive-like behavior in vivo and activates brain indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures. **J. Neuroinflamm.** 7, 43, 2010.

FUCHIKAMI M, MORINOBU S, SEGAWA M, OKAMOTO Y, YAMAWAKI S, OZAKI N, INOUE T, KUSUMI I, KOYAMA T, TSUCHIYAMA K, TERAO T. DNA methylatipon profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. **PLoS One**; 6: e23881, 2011.

GAILLARD, R.C., SPINEDI, E. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. **Domest. Anim. Endocrinol.** 15, 345–352, 1998.

GALECKI P, FLORKOWSKI A, BOBIŃSKA K, ŚMIGIELSKI J, BIEŃKIEWICZ M, SZEMRAJ J. Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene (G-463A) in depressive patients. **Acta Neuropsychiatrica**; 22(5):218–22, 2010.

GALECKI P, KEDZIORA J, FLORKOWSKI A, GAŁLECKA E. Lipid peroxidation and copper-zinc superoxide dismutase activity in patients treated with fluoxetine during the first episode of depression. **Psychiatr Pol.** 41(5):615–24, 2007.

GALECKI P, SZEMRAJ J, BIEŃKIEWICZ M, ZBORALSKI K, GAŁLECKA E. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. **Hum Psychopharmacol**, 24:277–86, 2009a.

GARATE I, GARCIA-BUENO B, MADRIGAL JL, BRAVO L, BERROCOSO E, CASO JR, MICO JA, LEZA JC. Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. **J Neuroinflamm.** 8:1742–2094, 2011.

GARDEN, GA, MOLLER, T. Microglia biology in health and disease. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 1, n. 2, p. 127-137, 2006.

GARDNER, A.; BOLES, R. G. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. **Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, special issue, 2010.

GARRIDO-MESA N, ZARZUELO A, GALVEZ J. Minocycline: far beyond an antibiotic. **British Journal of Pharmacology.** 26:12139, 2013.

GATER, R, TANSELLA, M, KORTEN, A, TIEMENS, BG, MAVREAS, VG, OLATAWURA, MO. Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. **Arch Gen Psychiatry.** 55:405–413, 1998.

GE, L; LIU, L; LIU, H; LIU, S; XUE, H; WANG, X; YUAN, L; WANG, LIU D. Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice. **European Journal of Pharmacology** 768. 49–57, 2015.

GHORBEL, MT, SHARMAN, G, LEROUX, M, BARRETT, T, DONOVAN, DM, BECKER, KG, MURPHY, D. Microarray analysis reveals interleukin-6 as a novel

secretory product of the hypothalamo-neurohypophyseal system. **J. Biol. Chem.** 278, 19280-19285, 2003.

GODBOUT, J. P.; ABRAHAM, J.; RICHWINE, A.F.; BERG, B. M.; KELLEY, K. W.; JOHNSON, R. W. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. **FASEB J.**, v. 19, n. 10, p. 1329- 1331, 2005.

GODBOUT, JP, MOREAU, M, LESTAGE, J, CHEN, J, SPARKMAN, NL, CONNOR, JO, CASTANON, N, KELLEY, KW, DANTZER, R, JOHNSON, RW. Aging Exacerbates Depressive-like Behavior in Mice in Response to Activation of the Peripheral Innate Immune System. **Neuropsychopharmacology**. Epub: Dec 12, 2007.

GOEHLER, L.E.; GAYKEMA, R.P.; HAMMACK, S.E.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Interleukin-1 induces c-Fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. **Brain Res.**, v. 804, n. 2, p. 306-310, 1998.

GONZÁLEZ, J.C., EGEA, J., DEL CARMEN GODINO, M., FERNANDEZ-GOMEZ, F.J., SÁNCHEZ-PRieto, J., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G., JORDÁN, J., HERNÁNDEZ-GUIJO, J.M. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. **Eur. J. Neurosci.** 26, 2481–2495, 2007.

GORDON PH, MOORE DH, GELINAS DF, QUALLS C, MEISTER ME, WERNER J, MENDOZA M, MASS J, KUSHNER G, MILLER RG. Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology** 62:1845–1847, 2004.

GORENSTEIN, C; GLEZER, I; MARCOURAKIS, T; AVELLAR, MCW; SCAVONE, C. The role of the transcription factor NF-κB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Rev Bras Psiquiatr.** 22(1):26-30, 2000.

GOURLEY SL, WU FJ, KIRALY DD, PLOSKI JE, KEDVES AT, DUMAN RS, TAYLOR JR. Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. **Biol Psychiatry.** 63(4):353–359, 2008.

GRAEFF, FG, BRANDÃO, ML. Neurobiologia das doenças mentais. São Paulo: **Lemos Editorial.** 5 ed. 1999.

GRASES, G, COLOM, MA, FERNANDEZ, RA, COSTA-BAUZA, A, GRASES, F. Evidence of higher oxidative status in depression and anxiety, **Oxid. Med. Cell. Longev.** 5. 2014.

GREEN, PS, MENDEZ, AJ, JACOB, JS, CROWLEY, JR, GROWDON, W, HYMAN, BT, HEINECKE, JW. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. **J Neurochem,** 90:724–33, 2004.

GRIGOLEIT JS, KULLMANN JS, WOLF OT, HAMMES F, WEGNER A, JABLONOWSKI S, ENGLER H, GIZEWSKI E, OBERBECK R, SCHEDLOWSKI M.

Dose-dependent effects of endotoxin on neurobehavioral functions in humans. **PLoS One** 6:2, 2011.

GRIGORIADIS, S., ROBINSON, G.E. Gender issues in depression. **Ann. Clin. Psychiatry**. 19, 247–255, 2007.

GRIMES CA, JOPE RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. **Prog Neurobiol**. 2001;65:391–426, 2001.

GROVES, JO. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? **Mol Psychiatry**. 12(12):1079–1088, 2007.

GUAN L, JIA N, ZHAO X, ZHANG X, TANG G, YANG L, SUN H, WANG D, SU Q, SONG Q, CAI, D, CAI, Q, LI, H, ZHU, Z. The involvement of ERK/CREB/Bcl-2 in depression-like behavior in prenatally stressed offspring rats. **Brain Res Bull**. 99:1–8, 2013.

GUHA, M., MACKMAN, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. **J. Biol. Chem**. 277: 32124–32132., 2002.

GUO T, GUO Z, YANG X, SUN L, WANG S, YINGGE A, HE X, YA T. The alterations of IL-1Beta, IL-6, and TGF-beta levels in hippocampal CA3 region of chronic restraint stress rats after electroacupuncture (EA) pretreatment. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2014:369158, 2014.

GUO, J; LIN, P; ZHAO, X; ZHANG, J; WEI, X; Q. WANG, Q; WANG, C. Etazolate abrogates the lipopolysaccharide (lps)-induced downregulation of the camp/pcreb/bdnf signaling, neuroinflammatory response and depressive-like behavior in mice. **Neuroscience** 263, 1–14, 2014.

HAASE, J, BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? **Pharmacol Ther**. 147:1-11, 2015.

HANKIN, BL, ABRAMSON, LY, MOFFITT, TE, SILVA, PA, MCGEE, R, ANGELL, KE. Development of depression from preadolescence to young adulthood: emerging gender differences in a 10-year longitudinal study. **J. Abnorm. Psychol.**,107:128–140, 1998.

HANNESTAD J, DELLAGIOIA N, BLOCH M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. **Neuropsychopharmacology**. 36:2452-9, 2011.

HARRISBERGER F, SMIESKOVA R, SCHMIDT A, LENZ C, WALTER A, WITTFELD K, GRABE HJ, LANG UE, FUSAR-POLI P, BORGWARDT S. BDNF Val66Met polymorphism and hippocampal volume in neuropsychiatric disorders: a systematic review and meta-analysis. **Neurosci Biobehav Rev**. 55:107–18, 2015.

HART, BL. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. **Neurosci Biobehav Rev.** 14(3):273–94, 1990.

HART, BL. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 12, p.123–137, 1988.

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

HASHIOKA, S, KLEGERIS A, MONJI A, KATO T, SAWADA M, MCGEER PL, KANBA S. Antidepressants inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. **Exp Neurol** 206(1):33–42, 2007.

HAYASHI Y, Y. M.; YAMATO, M.; IDE, T.; WU, Z.; OCHI-SHINDOU, M. Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor A in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 8624–8634, 2008.

HAYLEY, S, LACOSTA, S, MERALI, Z, VAN ROOIJEN, N, ANISMAN, H. Central monoamine and plasma corticosterone changes induced by a bacterial endotoxin: sensitization and cross-sensitization effects. **Eur J Neurosci.** 13(6):1155–65, 2001.

HAYLEY, S, MERALI, Z, ANISMAN, H. Stress and cytokine-elicited neuroendocrine and neurotransmitter sensitization: implications for depressive illness. **Stress.** 6(1):19–32, 2003.

HENEKA, MT, RODRÍGUEZ, JJ, VERKHRATSKY, A. Neuroglia in neurodegeneration. **Brain Res Rev.** 2 (63):189–211, 2010.

HENINGER, GR. Serotonin, sex, and psychiatric illness. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94:4823–482, 1997.

HENRY CJ, HUANG Y, WYNNE A, HANKE M, HIMLER J, BAILEY MT, SHERIDAN JF, GODBOUT JP. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **J Neuroinflamm.** 5:15, 2008.

HEUMANN, D.; GLAUSER, M.P.; CALANDRA, T. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. **Curr Opin Microbiol.**, 1:49-55, 1998.

HEYSER, C. J.; MASLIAH, E.; SAMIMI, A.; CAMPBELL, I. L.; GOLD, L. H. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 4, p. 1500- 1505, 1997.

HOEBE, K., DU, X., GEORGEL, P., JANSSEN, E., TABETA, K., KIM, S.O., GOODE, J., LIN, P., MANN, N., MUDD, S., CROZAT, K., SOVATH, S., HAN, J. AND BEUTLER, B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. **Nature**, 424, 743-748, 2003.

HOLDEN, C. Sex and the suffering brain. **Science** 308, 1574, 2005.

HOLSBOER, F, ISING, M. Central CRH system in depression and anxiety: evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. **Eur. J. Pharmacol.** 583, 350-357, 2008.

HORIKAWA, H, KATO, TA, MIZOGUCHI, Y, MONJI, A, SEKI, Y, OHKURI, T, GOTOH, L, YONAHARA, M, UEDA, T, HASHIOKA, S, KANBA, S. Inhibitory effects of SSRIs on IFN-gamma induced microglial activation through the regulation of intracellular calcium. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 34:1306–16, 2010.

HORVATH RJ, NUTILE-MCMENEMY N, ALKAITIS MS, DELEO JA. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. **J Neurochem** 107:557–569, 2008.

HOSHINO K, TAKEUCHI O, KAWAI T, SANJO H, OGAWA T, TAKEDA Y, TAKEDA K, AKIRA S. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J Immunol**, 162:3749–3752, 1999.

HOWELL, O. W., RUNDLE, J. L., GARG, A., KOMADA, M., BROPHY, P. J., AND REYNOLDS, R. Activated microglia mediate axonal disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 69, 1017–1033, 2010.

HU, Y., WU, D.L., LUO, C.X., ZHU, L.J., ZHANG, J., WU, H.Y., ZHU, D.Y. Hippocampal nitric oxide contributes to sex difference in affective behaviors. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 109, 14224–14229, 2012.

HUANG E, REICHARDT LF. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. **Annu Rev Biochem** 72:609 – 642, 2003.

HUANG W, ZHAO Y, ZHU X, CAI Z, WANG S, YAO S, QI Z, XIE P. Fluoxetine upregulates phosphorylated-AKT and phosphorylated-ERK1/2 proteins in neural stem cells: evidence for a crosstalk between AKT and ERK1/2 pathways. **J Mol Neurosci.** 49(2):244–249, 2013.

HUANG WC, LIN YS, WANG CY, TSAI CC, TSENG HC, CHEN CL, LU PJ, CHEN PS, QIAN L, HONG JS, LIN CF. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. **Immunology** 128(1 Suppl):e275–e286, 2009.

HUANG, Y.; HENRY, C. J.; DANTZER, R.; JOHNSON, R. W.; GODBOUT, J. P. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiol. Aging**, v. 29, n. 11, 1744-1753, 2007.

HUNOT S, BRUGG B, RICARD D, MICHEL PP, MURIEL MP, RUBERG M, ET AL. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94:7531-6, 1997.

HYTTEL, J, BØGESØ, KP, PERREGAARD, J, SÁNCHEZ, C. The pharmacological effect of citalopram residues in the (S)-(+)-enantiomer. **J. Neural Transm. Gen. Sect.**. 88 (2), 157–160, 1992.

INGALLS, R.R.; GOLENBOCK, D.T. CD11c/CD18,a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. **J Exp Med.**, 181:1473-1479, 1995.

IRIE, M., ASAMI, S., IKEDA, M., KASAI, H. Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 311 (4), 1014–1018, 2003.

IRITANI, S, TOHGI, M, ARAI, T, IKEDA, K. Immunohistochemical study of the serotonergic neuronal system in an animal model of the mood disorder. **Exp Neurol.** 201(1):60-5, 2006.

J. ANGST, A. GAMMA, R. SELLARO, H. ZHANG, K. MERIKANGAS. Toward validation of atypical depression in the community: results of the Zurich cohort study. **J. Affect. Disord.**, 72; 125-138, 2002.

JACOBSON KA, GAO ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov** 5(3):247–264, 2006.

JANGRA, A, LUKHI, MM, SULAKHIYA, K, BARUAH, C C, LAHKAR, M. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 740, 337–345, 2014.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. **Mol. Cell**, 11, 293-302, 2003.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **J Intensive Care Med.**, 22:63-72, 2007.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, 53, S26–S36, 2003.

JI, W W, WANG, S Y, MA, Z Q, LI, R P, LI, S S, XUE, J S, LI, W, NIU, X X, YANB, L, ZHANGC, X, FUA, Q, QUD, R, MA, S P, . Effects of perillaldehyde on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 116, 1–8, 2014.

JIANG Y, ZHU J, WU L, XU G, DAI J, LIU X. Tetracycline inhibits local inflammation induced by cerebral ischemia via modulating autophagy. **PLoS One**. 7:7, 2012.

JOCA, S R, FERREIRA, F R, GUIMARAES, F S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. **Stress**.10(3):227-49, 2007.

JOFFE, H, COHEN, LS. Estrogen, serotonin, and mood disturbance: where is the therapeutic bridge? **Biol Psychiatry** 44:798–811, 1998.

JOHNSON, J D, O'CONNOR, K A, WATKINS, L R, MAIER, S F. The role of IL-1beta in stress-induced sensitization of proinflammatory cytokine and corticosterone responses. **Neuroscience**. 127:569–577, 2004.

JOHNSON, R.W. The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. **Vet. Immunol. Immunopathol**. 87 (3–4), 443–450, 2002.

JONES, D. P., CARLSON, J. L., MODY, V. C., CAI, J. Y., LYNN, M. J., STERNBERG, P. Redox state of glutathione in human plasma. **Free Radic. Biol. Med.**, 28, 625–635, 2000.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochemical Research**. v. 32, n. 4, p. 577-595, 2007.

JOPE, R.S., JOHNSON, G.V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends Biochem. Sci**. 29, 95-102, 2004.

JOPE, RS. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. **Front Mol Neurosci**. Aug 9;4:16., 2011.

JURGENS, H A, JOHNSON, R W. Dysregulated neuronal–microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. **Exp Neurol**. 233:40–8, 2012.

KABIERSCH, A, DEL REY, A, HONEGGER, C G, BESEDOVSKY, H O. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. **Brain Behav Immun**. 2:267–274, 1988.

KAGEYAMA, K, SUDA, T. Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. **Endocr. J**. 56, 335-344, 2009.

KANNINEN K, WHITE AR, KOISTINAHO J, MALM T. Targeting glycogen synthase kinase-3b for therapeutic benefit against oxidative stress in Alzheimer's disease: involvement of the Nrf2- ARE pathway. **Int J Alzheimers Dis** 2011:985085, 2011.

KANTROWITZ, J.T.; JAVITT, D.C. N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: The final common pathway on the road to schizophrenia? **Brain Research Bulletin** v.83, p.108–121, 2010.

KARATSOREOS, IN; MCEWEN, BS. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. **Trends Cogn Sci** 15(12):576–584, 2011.

KAREGE F, PERRET G, BONDOLFI G, SCHWALD M, BERTSCHY G, AUBRY JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Res.**; 109: 143-148, 2002.

KASCKOW, J W, BAKER, D, GERACIOTI, T D. Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. **Peptides**, v. 22, n. 5, p. 845-851, 2001.

KASTER, M P, GADOTTI, V M, CALIXTO, J B, SANTOS, A R S, RODRIGUES A.L.S. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. **Neuropharmacology**. 62(1):419-26, 2012.

KATAFUCHI, T; IFUKU, M; MAWATARI, S; NODA, M; MIAKE, K; SUGIYAMA, M; FUJINO, T. Effects of plasmalogens on systemic lipopolysaccharide-induced glial activation and  $\beta$ -amyloid accumulation in adult mice. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1262, 85–92, 2012.

KELLEY, K W, BLUTHE, R M, DANTZER, R, ZHOU, J H, SHEN, W H, JOHNSON, R W, BROUSSARD, S R. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav. Immun.**, v. 17, n. 1, Suppl., p. 112-118, 2003.

KHANZODE, S D, DAKHALE, G N, KHANZODE, S S, SAOJI, A, PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep.** 8 (6), 365–370, 2003.

KIM SS, KONG PJ, KIM BS, SHEEN DH, NAM SY, CHUN W. Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> in BV2 microglial cells. **Arch Pharm Res** 27:314–318, 2004.

KIM, A. H., G. KHURSIGARA, X. SUN, T. F. FRANKE, AND M. V. CHAO. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. **Mol. Cell. Biol.** 21: 893–901, 2001.

KIM, Y S, CHOI, D H, BLOCK, M L, LORENZL, S, YANG, L, KIM, Y J, SUGAMA, S, CHO, B P, HWANG, O, BROWNE, S E, KIM, S Y, HONG, J S, BEAL, M F, JOH, T H. A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. **Faseb J** 21:179–187, 2007.

KITAMURA, Y, YANAGISAWA, D, TAKATA, K, TANIGUCHI, T. Neuroprotective function in brain microglia. **Curr Anaesth Criti Care**. 20:142–7, 2009.

KITCHENS, R L, WOLFBAUER, G, ALBERS, J J, MUNFORD, R S. Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. **J Biol Chem.**, 274:34116-34122, 1999.

KLATT, P., LAMAS, S. Regulation of protein function by S- glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. **Eur. J. Biochem.**, 267, 4928–4944, 2000.

KLEIN, S.L. Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and treatments for viral diseases. **Bioessays** 34, 1050–9, 2012.

KONSMAN, J P, LUHESHI, G N, BLUTHE, R M, DANTZER, R. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, n. 12, p. 4434–4446, 2000.

KONSMAN, J P, VEENEMAN, J, COMBE, C, POOLE, S, LUHESHI, G N, DANTZER, R. Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. **Eur. J. Neurosci.**, v. 28, p. 2499–2510, 2008.

KONSMAN, JAN PIETER, PARNET, PATRICIA; DANTZER, ROBERT. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences** Vol.25 No.3 March 2002.

KOO, J.W., DUMAN, R.S. Evidence for IL-1 receptor blockade as a therapeutic strategy for the treatment of depression. **Curr. Opin. Investig. Drugs**.10, 664–671, 2009.

KORNSTEIN, S G, SCHATZBERG, A F, THASE, M E, YONKERS, K A, MCCULLOUGH, J P, KEITNER, G I, GELENBERG, A J, DAVIS, S M, HARRISON, W M, KELLER, M B. Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. **Am J Psychiatry**. 157:1445–1452, 2000.

KOSKINAS, J., MERKOURAKI, P., MANESIS, E., HADZIYANNIS, S. Assessment of depression in patients with chronic hepatitis: effect of interferon treatment. **Dig. Dis**. 20, 284–288, 2002.

KOVACIC, P., & JACINTHO, J. D. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr. Med. Chem.**, 8, 773–796, 2001.

KRAEMER, B, NOLL, T, DELSIGNORE, A, MILOS, G, SCHNYDER, U, HEPP, U. Finger length ratio (2D:4D) in adults with gender identity disorder. **Archives of Sexual Behavior**, 38, 359–363, 2009.

KRAKAUER, T, BUCKLEY, M. Doxycycline Is Anti-Inflammatory and Inhibits Staphylococcal Exotoxin-Induced Cytokines and Chemokines. **Antimicrob. Agents Chemother**. p. 3630–3633, 2003.

KRANJAC, D, MCLINDEN, K A, DEODATI, L E, PAPINI, M R, CHUMLEY, M J, BOEHM, G W. Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice. **Brain Behav Immun**. 26:109–21, 2012.

KREUTZBERG, G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.**, v. 19, p. 312–318, 1996.

KRISHNAN V, NESTLER EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. **Curr Top Behav Neurosci.** 7:121–47, 2011.

KRISHNAN V., NESTLER E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature.** 455:894–902, 2008.

KRISTIANSEN JE, MORTENSEN I, GAARSLEV K. The antibiotic effect of the anti-depressive drug femoxetine and its stereo-isomeric analogs on diarrhoea producing enterobacteriaceae. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology.** 94:103-6, 1986.

KUBERA M, CURZYTEK K, DUDA W, LESKIEWICZ M, BASTA-KAIM A, BUDZISZEWSKA B, ROMAN A, ZAJICOVA A, HOLAN V, SZCZESNY E, LASON W, MAES M. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months. **Brain Behav Immun.** 31:96–104, 2013.

KUBERA M, OBUCHOWICZ E, GOEHLER L, BRZESZCZ J, MAES M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 35(3):744–759 , 2011.

KUBERA, M, LIN, A H, KENIS, G, BOSMANS, E, VAN BOCKSTAELE, D, MAES, M. Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. **J Clin Psychopharmacol.** 21:199–206, 2001.

KUBERA, M, OBUCHOWICZ, E, GOEHLER, L, BRZESZCZ, J, MAES, M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 35 (3), 744–759, 2011b.

KUBERA, M; CURZYTEK, K; DUDA, W; LESKIEWICZ, M; BASTA-KAIM, A; BUDZISZEWSKA, B; ROMAN, A; ZAJICOVA, A; HOLAN, V; SZCZESNY, E; LASON, W; MAES, M. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months. **Brain, Behavior, and Immunity.** 31, 96–104, 2013.

KUBERA, M; LIN, AH; KENIS, G; BOSMANS, E; VAN BOCKSTAELE, D; MAES, M. Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. **J Clin Psychopharmacol,** 21, pp. 199-206, 2001.

KUEHNER, C. Gender differences in unipolar depression: an update of epidemiological findings and possible explanations **Acta Psychiatr. Scand.,** 108,163-174, 2003.

KULLMANN, JS, GRIGOLEIT, JS; LICHTER, P; KOBBE, P; ROSENBERGER, C; BANNER, C; WOLF, O.T; ENGLER, H; OBERBECK, R; ELSENBRUCH, S; BINGEL, U; FORSTING, M; GIZEWSKI, ER; SCHEDLOWSKI, M. Neural response to

emotional stimuli during experimental human endotoxemia. **Hum. Brain Mapp.** 28,22063, 2012.

KULOGLU, M., ATMACA, M., TEZCAN, E., GECICI, O., TUNCKOL, H., USTUNDAG, B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive–compulsive disorder. **Neuropsychobiology.** 46, 27–32, 2002a.

KUO JR, CHENG YH, CHEN YS, CHIO CC, GEAN PW. Involvement of extracellular signal regulated kinases in traumatic brain injury-induced depression in rodents. **J Neurotrauma.** 30(14):1223–1231, 2013.

LACOSTA, S, MERALI, S, ANISMAN, H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. **Brain Res.**, v. 818, p. 291–303, 1999.

LAFLAMME, N, LACROIX, S, RIVEST, S. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 24, p. 10923-10930,1999.

LAI, A Y, TODD, K G. Hypoxia-activated microglial mediators of neuronal survival are differentially regulated by tetracyclines. **Glia.** 53:809–816, 2006.

LAMERS, F; DE JONGE, P; NOLEN, WA; SMIT, JH; ZITMAN, FG; BEEKMAN, AT; PENNINX, BW. Identifying depressive subtypes in a large cohort study: results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). **J. Clin. Psychiatry,** 71;1582-1589, 2010.

LASS-FLORL C, DIERICH MP, FUCHS D, SEMENITZ E, JENEWEIN I, LEDOCHOWSKI M. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 48:775-9, 2001.

LAVICKY, J, DUNN, A J. Endotoxin administration stimulates cerebral catecholamine release in freely moving rats as assessed by microdialysis. **J Neurosci Res.** 40:407–413, 1995.

LAYE, S, PARNET, P, GOUJON, E, DANTZER, R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. **Molecular Brain Research.** 27,157-162, 1994.

LE W., ROWE D., XIE W., ORTIZ I., HE Y., APPEL S. H. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an *in vitro* model relevant to Parkinson's disease. **J. Neurosci.** 21, 8447–8455., 2001.

LEE SY, LEE SJ, HAN C, PATKAR AA, MASAND PS, PAE CU. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 2012.

LEEM YH, YOON SS, KIM YH, JO SA. Disrupted MEK/ERK signaling in the medial orbital cortex and dorsal endopiriform nuclei of the prefrontal cortex in a chronic restraint stress mouse model of depression. **Neurosci Lett.** 580:163–168, 2014.

LEFKOWITZ, DL, LEFKOWITZ, SS. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. **Free Radic Biol Med.** 45:726–31, 2008.

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.** 36:764-85, 2012.

LEONARD, B E, SONG, C. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, p. 299–303, 1996.

LEONARD, B E, SONG, C. Stress, depression, and the role of cytokines. **Adv. Exp. Med. Biol.**,v. 461, p. 251–265, 1999.

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. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 36 (2), 764–785, 2012.

LEWINSOHN, P M, ROHDE, P, SEELEY, J R. Treatment of adolescent depression: frequency of services and impact on functioning in young adulthood. **Depress. Anxiety.** 7:47–52, 1998.

LI E, DENG H, WANG B, FU W, YOU Y, TIAN S. Apelin-13 exerts antidepressant-like and recognition memory improving activities in stressed rats. **Eur Neuropsychopharmacol.** 26(3):420–30, 2016.

LI J, LUO Y, ZHANG R, SHI H, ZHU W, SHI J. Neuropeptide trefoil factor 3 reverses depressive-like behaviors by activation of BDNF-ERK-CREB signaling in olfactory bulbectomized rats. **Int J Mol Sci.** 16(12):28386–400, 2015.

LI X, JOPE RS. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? **Neuropsychopharmacology** 35(11): 2143–2154, 2010.

LI X., ZHU W, ROH MS, FRIEDMAN AB, ROSBOROUGH K, JOPE RS. In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) by serotonergic activity in mouse brain. **Neuropsychopharmacology** 29, 1426–1431, 2004.

LI YF, CHENG YF, HUANG Y, CONTI M, WILSON SP, O'DONNELL JM, ZHANG HT. Phosphodiesterase-4D knock-out and RNA interference-mediated knock-down enhance memory and increase hippocampal neurogenesis via increased cAMP signaling. **J Neurosci.** 31:172–1783, 2011.

LI YF, HUANG Y, AMSDELL SL, XIAO L, O'DONNELL JM, ZHANG HT. Antidepressant and anxiolytic-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on behavior depend on cyclic AMP response element binding protein-

mediated neurogenesis in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34:2404–2419, 2009.

LI, J; LUO, Y; ZHANG, R; SHI, H; ZHU, W, SHI, J. Neuropeptide Trefoil Factor 3 Reverses Depressive-Like Behaviors by Activation of BDNF-ERK-CREB Signaling in Olfactory Bulbectomized Rats. *Int J Mol Sci.* 30;16(12):28386-400, 2015.

LI, N; HE, X; ZHANG, Y; QI, X; LI, H; ZHU, X; HE, S. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates antidepressant effects of lamotrigine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 14, pp. 1091-1098, 2011.

LI, X., ZHU, W., ROH, M. S., FRIEDMAN, A. B., ROSBOROUGH, K., AND JOPE, R. S. In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 29, 1426–1431, 2004.

LIAO, IL; ZHANG, XD; LI, J; ZHANG, ZW; YANG, CC; RAO, CL; ZHOU, CJ; ZENG, L; ZHAO, LB; FANG, L; YANG, DY; XIE, P. Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, modulates NF- $\kappa$ B/IL-6/STAT3, CREB/BDNF pathways and central serotonergic neurotransmission in mice. *International Immunopharmacology*. Vol 49, Pages 178-186, 2017

LIBERATORE GT, JACKSON-LEWIS V, VUKOSAVIC S, MANDIR AS, VILA M, MCAULIFFE WG, DAWSON VL, DAWSON TM, PRZEDBORSKI S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med.* Dec;5(12):1403-9, 1999.

LIEB, J. The immunostimulating and antimicrobial properties of lithium and antidepressants. *J. Infect.* 49, 88–93, 2004.

LINTHORST, A C, FLACHSKAMM, C, HOLLSBOER, F, REUL, J M. Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis activity. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2418–2430, 1995

LINTHORST, A C, FLACHSKAMM, C, MÜLLER-PREUSS, P, HOLLSBOER, F, REUL, J M. Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 15:2920–2934, 1995.

LINTHORST, A C, REUL, J M. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 139–152, 1998.

LIU AM, WONG YH. G16-mediated activation of nuclear factor kappaB by the adenosine A<sub>1</sub> receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signaling. *J Biol Chem* 279(51):53196–53204, 2004.

LIU B, GAO HM, WANG JY, JEOHN GH, COOPER CL, HONG JS. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 962:318–331, 2002.

LIU D, WANG Z, GAO Z, XIE K, ZHANG Q, JIANG H, PANG Q. Effects of curcumin on learning and memory deficits, BDNF, and ERK protein expression in rats exposed to chronic unpredictable stress. **Behav Brain Res**. 271:116–121, 2014.

LIU RP, FANG JL, RONG PJ, ZHAO Y, MENG H, BEN H, LI L, HUANG ZX, LI X, MA YG, ZHU B. Effects of electroacupuncture at auricular concha region on the depressive status of unpredictable chronic mild stress rat models. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2013:789674, 2013.

LIU, D, WANG Z, LIU S, WANG F, ZHAO S, HAO A. Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglial cells. **Neuropharmacology** 61(4):592–599, 2011.

LIU, D, WANG, Z, LIU, S, WANG, F, ZHAO, S, HAO, A. Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglial cells. **Neuropharmacology**. 61: 592–9, 2011.

LOCKEY, A.J., KAVALIERS, M., OSSENKOPP, K.P. Lipopolysaccharide produces dose-dependent reductions of the acoustic startle response without impairing prepulse inhibition in male rats. **Brain Behav Immun** 23, 101-107, 2009.

LORIA, V; DATO, I; GRAZIANI, F; BIASUCCI, LM. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. **Mediators Inflamm**. v2008;135625, 2008.

LOSEL, R; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 4; 46–56, 2003.

LYNCH, M A. The multifaceted profile of activated microglia. **Mol Neurobiol**. 40:139–56, 2009.

MAES M, FISAR Z, MEDINA M, SCAPAGNINI G, NOWAK G, BERK M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates-Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology**. 20:127-150, 2012.

MAES M, GALECKI P, CHANG YS, BERK M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry**. 35:676e92, 2011a.

MAES M, LEONARD BE, MYINT AM, KUBERA M, VERKERK R. The new ‘5-HT’ hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 35:702-21, 2011b.

MAES M, MIHAYLOVA I, KUBERA M, UYTTERHOEVEN M, VRYDAGS N, BOSMANS E. Increased plasma peroxides and serum oxidized low density lipoprotein antibodies in major depression: Markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. **J Affect Disord**. Jan 16, 2010a.

MAES M, SCHARPÉ S, MELTZER HY, OKAYLI G, BOSMANS E, D'HONDT P, VANDEN BOSSCHE BV, COSYNS P. Increased neopterin and interferon-gamma secretion and lower availability of L-tryptophan in major depression: further evidence for an immune response. **Psychiatry Res**. 54(2):143–60, 1994.

MAES M, SONG C, YIRMIYA R. TARGETING. IL-1 in depression. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. 6:1097e112, 2012b.

MAES M, STEVENS WJ, DECLERCK LS, BRIDTS CH, PEETERS D, SCHOTTE C, COSYNS P. Significantly increased expression of T-cell activation markers (interleukin- 2 and HLA-DR) in depression: further evidence for an inflammatory process during that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 17:241-55, 1993.

MAES M, VANDOOOLAEGHE E, NEELS H, DEMEDTS P, WAUTERS A, MELTZER HY, ALTAMURA C, DESNYDER R. Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness. **Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry** 42:349–358, 1997.

MAES M, YIRMYIA R, NORABERG J, BRENE S, HIBBELN J, PERINI G, KUBERA M, BOB P, LERER B, MAJ M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metabolic Brain Disease**. 24: 27-53, 2009.

MAES M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuro Endocrinol Lett**. 29(3):287–91, 2008.

MAES, M, BERK, M, GOEHLER, L, SONG, C, ANDERSON, G, GALECKI, P, LEONARD, B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. **BMC Med**. 10, 66, 2012a.

MAES, M, BOSMANS, E, DE JONGH, R, KENIS, G, VANDOOOLAEGHE, E, NEELS H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. **Cytokine**. 9:853–858, 1997.

MAES, M, BOSMANS, E, MELTZER, H Y, SCHARPE, S, SUY, E. Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? **Am. J. Psychiatry**, v. 150, n. 8, p. 1189–1193, 1993a.

MAES, M, BOSMANS, E, SUY, E, VANDERVORST, C, DEJONCKHEERE, C, RAUS, J. Depression-related disturbances in mitogen-induced lymphocyte responses and interleukin- 1 beta and soluble interleukin-2 receptor production. **Acta Psychiatr. Scand.**, v. 84, n. 4, p. 379–386, 1991b.

MAES, M, BOSMANS, E, SUY, E, VANDERVORST, C, JONCKHEERE, C, RAUS, J. Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. **Neuropsychobiology**, v. 24, n. 3, p. 115–120, 1990-1991.

MAES, M, CHRISTOPHE, A, DELANGHE, J, ALTAMURA, C, NEELS, H, MELTZER, H Y. Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. **Psychiatry Res.** 85 (3), 275–291, 1999a.

MAES, M, DE VOS, N, PIOLI, R, DEMEDTS, P, WAUTERS, A, NEELS, H, CHRISTOPHE, A. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. **J. Affect. Disord.** 58 (3), 241–246, 2000.

MAES, M, GALECKI, P, CHANG, Y S, BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 35 (3), 676–692, 2011a.

MAES, M, KUBERA, M, LEUNIS, J C, BERK, M. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. **Journal of Affective Disorders.** 141:55-62, 2012a.

MAES, M, LAMBRECHTS, J, BOSMANS, E, JACOBS, J, SUY, E, VANDERVORST, C. Evidence for a systemic immune activation during depression, results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining. **Psychol. Med.**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 1992.

MAES, M, LEONARD, B, FERNANDEZ, A, KUBERA, M, NOWAK, G, VEERHUIS, R, GARDNER, A, RUCKOANICH, P, GEFFARD, M, ALTAMURA, C, GALECKI, P, BERK, M. Editorial: (Neuro)inflammation and neuroprogression as new pathways and drug targets in depression: from antioxidants to kinase inhibitors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 659–663, 2011d.

MAES, M, LIN AH, DELMEIRE, L, VAN GASTEL, A, KENIS, G, DE JONGH, R, BOSMANS, E. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in post-traumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. **Biol Psychiatry.** 45:833–9, 1999.

MAES, M, MELTZER, H Y, STEVENS, W, COSYNS, P, BLOCKX, P. Multiple reciprocal relationships between in vivo cellular immunity and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in depression. **Psychol Med.** 24(1):167–77, 1994b.

MAES, M, MELTZER, HY, SCHARPE, S, COOREMAN, W, UYTENBROECK, W, SUY, E, VAN-DERVORST, C, CALABRESE, J, RAUS, J, COSYNS, P. Psychomotor retardation, anorexia, weight loss, sleep disturbances, and loss of energy: psychopathological correlates of hyperhaptoglobinemia during major depression. **Psychiatry Res.** 47:229–41, 1993.

MAES, M, MIHAYLOVA, I, KUBERA, M, UYTTERHOEVEN, M, VRYDAGS, N, BOSMANS, E. Increased plasma peroxides and serum oxidized low density lipoprotein antibodies in major depression: markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. **Journal of Affective Disorders**.125:287-94, 2010.

MAES, M, SCHARPE, S, MELTZER, H Y, BOSNMANS, E, SUY, E, CALABRESE, J, COSYNS, P. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. **Psychiatry Res.**, v. 49, n. 1, p. 11–27, 1993d.

MAES, M, SCHARPE, S, MELTZER, H Y, COSYNS, P. Relationships between increased haptoglobin plasma levels and activation of cell-mediated immunity in depression. **Biol. Psychiatry**, v. 34, n. 10, p. 690–701, 1993e.

MAES, M, SMITH, R, SHARPE, S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 111-116, 1995.

MAES, M, SONG, C, LIN, A H, BONACCORSO, S, KENIS, G, DE JONGH, R, BOSMANS, E, SCHARPÉ, S. Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. **Neuropsychopharmacology**. 20 (4), 370–379., 1999b.

MAES, M, SONG, C, YIRMIYA, R. Targeting IL-1 in depression. **Expert Opin. Ther. Targets**. 16, 1097–1112, 2012c.

MAES, M, SONG, C, YIRMIYA, R. Targeting Il-1 in Depression. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 27, p. 27, 2012.

MAES, M, YIRMYIA, R, NORABERG, J, BRENE, S, HIBBELN, J, PERINI, G, KUBERA M, BOB, P, LERER, B, MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab Brain Dis**. 24(1):27–53, 2009.

MAES, M; FISAR, Z; MEDINA, M; SCAPAGNINI, G; NOWAK, G; BERK, M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates—Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacol**. 20:127–150, 2012.

MAES, M; GALECKI, P; CHANG, YS; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry** 35, 676–692, 2011.

MAES, M. A review on the acute phase response in major depression. **Rev. Neurosci.**, v. 4, n. 4, p. 407–416, 1993.

MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune

activation is the key component of depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 35 (3), 664–675, 2011.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 461, p. 25–46, 1999.

MAES, M. Psychological stress and the inflammatory response system. **Clin Sci (Lond)**.101:193–4, 2001.

MAES, M., YIRMYIA, R., NORABERG, J., BRENE, S., HIBBELN, J., PERINI, G., KUBERA, M., BOB, P., LERER, B., MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab. Brain Dis.** 24, 27–53, 2009.

MAITRA, U, ENG, H, GLAROS, T, BAKER, B, CAPELLUTO, D G, LI, Z, LI, L. Molecular mechanisms responsible for the selective and low-grade induction of proinflammatory mediators in murine macrophages by lipopolysaccharide. **J Immunol**,189:1014–23, 2012.

MALLE E, FURTMÜLLER PG, SATTLER W, OBINGER C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br J Pharmacol**;152:838–54, 2007.

MALM, T. M., MAGGA, J., KUH, G. F., VATANEN, T., KOISTINAHO, M., AND KOISTINAHO, J. Minocycline reduces engraftment and activation of bone marrow-derived cells but sustains their phagocytic activity in a mouse model of Alzheimer's disease. **Glia.** 56, 1767–1779, 2008.

MALTZBERG, B. Mortality among patients with involuntal melancholia. **Am. J. Psychiatry**, 93:1231–1238, 1937.

MANCO M, PUTIGNANI L, BOTTAZZO GF. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. **Endocr Rev.**;31:817–844, 2010.

MARAZZITI, D, CONSOLI, G, PICCETTI, M, CARLINI, M, FARAVELLI, L. Cognitive impairment in major depression. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 626, p. 83–86, 2010.

MARCUS, S.M., YOUNG, E.A., KERBER, K.B., KORNSTEIN, S., FARABAUGH, A.H., MITCHELL, J., WISNIEWSKI, S.R., BALASUBRAMANI, G.K., TRIVEDI, M.H., RUSH, A.J. Gender differences in depression: findings from the STAR\*D study. **J. Affect. Disord.** 87, 141–150, 2005.

MARCUS, SM; KERBER, KB; RUSH, AJ; WISNIEWSKI, SR; NIERENBERG, A; BALASUBRAMANI, GK; RITZ, L; KORNSTEIN, S; YOUNG, EA; TRIVEDI, MH. Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study. **Compr. Psychiatry**, 49; 238-246, 2008.

MARCUS, SM; YOUNG, EA; KERBER, KB; S. KORNSTEIN, S; FARABAUGH, AH; MITCHELL, J; WISNIEWSKI, SR; BALASUBRAMANI, GK; TRIVEDI, MH; RUSH, AJ. Gender differences in depression: findings from the STAR\*D study. **J. Affect. Disord.**, 87;141-150, 2005.

MARRIOTT, I, BOST, K L, HUET-HUDSON, Y M. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: a possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. **J Reprod Immunol**, 71:12–27, 2006.

MARRIOTT, I., HUET-HUDSON, Y.M. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. **Immunol. Res.** 34, 177–192, 2006.

MARSDEN, WN. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 43:168–184, 2013.

MARTIN, M; REHANI, K; JOPE, RS; MICHALEK, SM. Toll-like receptor—mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. **Nat Immunol**. Aug; 6(8): 777–784, 2005.

MARVAN ML, CHAVEZ-CHAVEZ L, SANTANA S. Clomipramine modifies fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. **Arch Med Res**. 27:83–86, 1996.

MASELLA, R., DI BENEDETTO, R., VARI, R., FILESI, C., & GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J. Nutr. Biochem.**, 16, 577–586, 2005.

MATHEW, S.J., MANJI, H.K., CHARNEY, D.S. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. **Neuropsychopharmacology** 33, 2080–2092, 2008.

MATHISON, J C, TOBIAS, P S, WOLFSON, E, ULEVITCH, R J. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein: A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. **J Immunol.**, 149:200-206, 1992.

MATRISCIANO, F.; BONACCORSO, S.; RICCIARDI, A.; SCACCIANOCE, S.; PANACCIONE, I.; WANG, L.; RUBERTO, A.; TATARELLI, R.; NICOLETTI, F.; GIRARDI, P.; SHELTON, RC. Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine. **J. Psychiatr. Res.** 43, 247–254, 2009.

MATTSON, MP. Free radicals, calcium, and the synaptic plasticity-cell death continuum: emerging roles of the transcription factor NF- $\kappa$ B. **Int Rev Neurobiol**. 42:103-68, 1998.

MATZA, LS; REVICKI, DA; DAVIDSON, JR; STEWART, JW. Depression with atypical features in the National Comorbidity Survey: classification, description, and consequences. **Arch. Gen. Psychiatry**, 60, 817-826, 2003.

MAZZUCHELLI C, BRAMBILLA R. Ras-related and MAPK signalling in neuronal plasticity and memory formation. **Cell Mol Life Sci**. 57(4):604–611, 2000.

MAZZUCHELLI C, VANTAGGIATO C, CIAMEI A, FASANO S, PAKHOTIN DP, FREZEL W, ET AL. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in

the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. **Neuron**. 807–820, 2002.

MCAFOOSE, J, BAUNE, B T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 33, p. 355–366, 2009.

MCCARTHY DM, TOMLINSON KL, ANDERSON KG, ALAN G, BROWN SA. Relapse in alcohol-and drug-disordered adolescents with comorbid psychopathology: changes in psychiatric symptoms. **Psychol Addict Behav** 19(1):28–34, 2005.

MCCULLOCH, C A, BIREK, P C. Estudo controlado randomizado de doxiciclina na prevenção da periodontite recorrente em pacientes de alto risco. **J. Clin. Periodontol.**, v. 17, p. 616-622, 1990.

MCGEER EG, KLEGERIS A, MCGEER PL. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. **Neurobiol Aging**. 2005;26(Suppl 1):94–97.

MCNALLY, L., BHAGWAGAR, Z., HANNESTAD, J. INFLAMMATION, glutamate, and glia in depression: a literature review. **CNS Spectr**. 13 (6), 501–510, 2008.

MCMAMEE, E N, RYAN, K M , GRIFFIN, E W, GONZÁLEZ-REYES, R E, RYAN, K J, HARKIN, A, CONNOR, T J. Noradrenaline acting at central  $\beta$ -adrenoceptors induces interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 expression in rat brain: implications for neurodegeneration. **Brain Behav. Immun**. 24 (4), 660–671, 2010.

MEANS, T K, GOLENBOCK, D T, FENTON, M J. The biology of toll-like receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 11:219-232, 2000.

MELLO, B S F, MONTE, A S, MCINTYRE, R S, SOCZYNSKA, CUSTODIO, C S, CORDEIRO, R C, CHAVES, J H, VASCONCELOS, S M M, NOBRE JUNIOR, H V, SOUSA, F C F, HYPHANTIS, T N, CARVALHO, A F, MACEDO, D S. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **J Psychiatr Res.**, Oct;47(10):1521-9, 2013.

MERALI, Z, BRENNAN, K, BRAU, P, ANISMAN, H. Dissociating anorexia and anhedonia elicited by interleukin-1beta: antidepressant and gender effects on responding for “free chow” and “earned” sucrose intake. **Psychopharmacology**, 165, 413–418, 2003.

MERCADO, CP; KILIC, F. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. **Mol Interv**, 10, pp. 231-241, 2010.

METZ LM, ZHANG Y, YEUNG M, PATRY DG, BELL RB, STOIAN CA, YONG VW, PATTEN SB, DUQUETTE P, ANTEL JP, MITCHELL JR. Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. **Ann Neurol**. 55:756 , 2013.

MEYER TE, HABENER JF. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. **Endocr Rev** 14: 269 –290, 1993.

MIKOVA, O, YAKIMOVA, R, BOSMANS, E, KENIS, G, MAES, M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 11, n. 3, p. 203–208, 2001.

MILANO, S, ARCOLEO, F; D'AGOSTINHO, P; CILLARI, E. Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. **Antimicrob Agents Chemother.** Jan;41(1):117-21, 1997.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.**, v. 70, p. 83–244, 2003.

MILLER, A H, MALETIC, V, RAISON, C L. Inflammation and its discontents: The role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**, 65:732–741, 2009.

MILLER, D B, O'CALLAGHAN, J.P. Depression, cytokines, and glial function. **Metabolism**, v. 54, Suppl. 1, p. 33–38, 2005.

MINEUR YS, PICCIOTTO MR, SANACORA G. Antidepressant-like effects of ceftriaxone in male C57BL/6J mice. **Biological Psychiatry**. 61:250-2, 2007.

MIYAOKA, T., WAKE, R., FURUYA, M., LIAURY, K., IEDA, M., KAWAKAMI, K., TSUCHIE, K., TAKI, M., ISHIHARA, K., ARAKI, T., HORIGUCHI, J. Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: an open-label study. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. 37, 222–226, 2012.

MO, Y, YAO, H, SONG, H, WANG, X, CHEN, W, ABULIZI J, XUA, TANG Y, HAN X, LIZ. Alteration of behavioral changes and hippocampus galanin expression in chronic unpredictable mild stress-induced depression rats and effect of electroacupuncture treatment. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2014:179796, 2014.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109–142, 1991.

MONTE, A.S., DE SOUZA, G.C., MCINTYRE, R.S., SOCZYNSKA, J.K., DOS SANTOS, J.V., CORDEIRO, R.C., RIBEIRO, B.M.M., DE LUCENA, D.F., VASCONCELOS, S.M.M., DE SOUSA, F.C.F., CARVALHO, A.F., MACÊDO, D.S. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. **J. Psychopharmacol**. 27, 1032–1043, 2013.

MONTEGGIA L M, LUIKART B, BARROT M, THEOBOLD D, MALKOVSKAI, NEF S, PARADA LF, NESTLER EJ. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. **Biol Psychiatry**.; 61: 187-197, 2007.

MONTMINY MR, GONZALEZ GA, YAMAMOTO KK. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. **Trends Neurosci** 13:184–188, 1990.

MORENO-NAVARRETE JM, MANCO M, IBANEZ J, GARCIA-FUENTES E, ORTEGA F, GOROSTIAGA E, VENDRELL J, IZQUIERDO M, MARTINEZ C, NOLFE G, RICART W, MINGRONE G, TINAHONES F, FERNANDEZ-REAL JM. Metabolic endotoxemia and saturated fat contribute to circulating NGAL concentrations in subjects with insulin resistance. **Int J Obes (Lond)**, Feb;34(2):240-9, 2009.

MORI M, MURATA Y, MATSUO A, TAKEMOTO T, MINE K. Chronic treatment with the 5-HT<sub>1A</sub> receptor partial agonist tandospirone increases hippocampal neurogenesis. **Neurol Ther**. 3(1):67–77, 2014.

MORRIS, M, LI L. Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming. **Arch Immunol Ther Exp.**, 60:13–8, 2012.

MOSS DW, BATES TE. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. **Eur J Neurosci**. 13:529–538, 2001.

MOWLA, SJ, FARHADI, HF, PAREEK, S, ATWAL, JK, MORRIS, SJ, SEIDAH, NG, MURPHY, RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to Brain derived Neurotrophic Factor. **J Biol Chem**. 276:12660-6, 2001.

MOYLAN S, MAES M, WRAY NR, BERK M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. **Molecular Psychiatry**. 18:595-606, 2013.

MOYLAN, S, MAES, M, WRAY, N R, BERK, M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. **Molecular Psychiatry**, 18:595-606, 2013.

MÜLLER, N, SCHWARZ, NJ. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. **Mol Psychiatry**, 12(11):988-1000, 2007.

MUNOZ-BELLIDO, J., MUNOZ-CRIADO, S., GARCIA-RODRIGUEZ, J. Antimicrobial activity of psychotropic drugs. **Int. J. Antimicrob. Agents** 14, 177–180, 2000a.

MUR, M, PORTELLA, MJ, MARTINEZ-ARAN, A, PIFARRE, J, VIETA, E. Long-term stability of cognitive impairment in bipolar disorder: a 2-year follow-up study of lithium-treated euthymic bipolar patients. **Journal of Clinical Psychiatry**, 69:712-9, 2008.

MUROI, M., TANAMOTO, K. TRAF6 distinctively mediates MyD88-and IRAK-1-induced activation of NF- $\kappa$ B. **J. Leukoc. Biol.**, 83, 702-707, 2008.

MURRAY, C. A.; LYNCH, M A. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 2974–2981, 1998.

MUSSELMAN, DL, BETAN, E, LARSEN, H, PHILLIPS, LS: Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: epidemiology, biology, and treatment. **Biol Psychiatry**, 54(3):317-329, 2003.

NAKAHIRA, K.; HASPEL, J. A.; RATHINAM, V. A. K.; LEE, S. J.; DOLINAY, T.; LAM, H. C. Autophagy proteins regulate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 12, p. 222–230, 2011.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S.A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis**, v. 14, p. 455–468, 2009.

NEMEROFF C B. Psychopharmacology of affective disorders in the 21st century. **Biol Psychiatry**, 44(7):517-25, 1998.

NEMEROFF, C B, WIDERLOV, E, BISSETTE, G, WALLEUS, H, KARLSSON, I, EKLUND, K, KILTS, C D, LOOSEN, P T, VALE, W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. **Science** 226, 1342-1344, 1984.

NESTLER EJ, BARROT M, DILEONE RJ, EISCH AJ, GOLD SJ, MONTEGGIA LM. Neurobiology of depression. **Neuron** 34:13–25, 2002.

NG, F, BERK, M, DEAN, O, BUSH, A I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 11, n. 6, p. 851-876, 2008.

NIBUYA, M., NESTLER, E.J., DUMAN, R.S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **J. Neurosci.** 16, 2365–2372, 1996.

NICIU MJ, IONESCU DF, MATHEWS DC, RICHARDS EM, ZARATE CA. Second messenger/signal transduction pathways in major mood disorders: moving from membrane to mechanism of action, part I: major depressive disorder. **CNS Spectr.** 1–10, 2013.

NIMMERJAHN, A, KIRCHHOFF, F, HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

NISHIDA A, HISAOKA K, ZENSHO H, UCHITOMI Y, MORINOBU S, YAMAWAKI S. Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. **Int Immunopharmacol.**, Nov;2(12):1619-26, 2002.

NOGUEIRA CR, DAMASCENO FM, DE AQUINO-NETO MR, DE ANDRADE GM, FONTENELE JB, DE MEDEIROS TA, et al. Doxycycline protects against pilocarpine-induced convulsions in rats, through its antioxidant effect and modulation of brain amino acids. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** 98:525-32, 2011.

NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255–6285, 2004.

NORENBERG, M.D. The reactive astrocyte. In: ASCHNER, M.; COSTA, L. G. (Ed.). *The Role of Glia in Neurotoxicity*. 2nd ed. Boca Raton, FL: **CRC Press**, p. 73–92, 2005.

O'CONNOR K A, JOHNSON J D, HANSEN M K, WIESELER FRANK, J L, MAKSIMOVA E, WATKINS L R, MAIER S F. Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. **Brain Res.**, 991:123–132, 2003.

O'CONNOR, J C, LAWSON, M A, ANDRÉ, C, MOREAU, M, LESTAGE, J, CASTANON, N, KELLEY, K W, DANTZER, R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Mol. Psychiatry**, 14 (5), 511–522, 2009.

O'CALLAGHAN J.P.; SRIRAM, K. GFAP and other glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. **Exp. Opin. Drug Safety**, v. 4, p. 433–442, 2005.

O'NEILL, LAJ, KALTSCHMIDT, C. NF- $\kappa$ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **TINS**. 20:252-8, 1997.

OHGI K, KAJIYA H, OKAMOTO F, NAGAOKA Y, ONITSUKA T, NAGAI A, SAKAGAMI R, OKABE K. A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl(-) extrusion in osteoclasts. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 386:589–598, 2013.

OHGI Y; FUTAMURA, T; KIKUCHI, T; HASHIMOTO, K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Volume 103. Issue 4, Pages 853-859, 2013.

OHKAWA, H, OHISHI, N, YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, 95:351–358, 1979.

OLSEN, NJ; KOVACS, WJ. Effects of androgens on T and B lymphocyte development, **Immunol. Res.** 23; 281–288, 2001.

OLSEN, NJ; KOVACS, WJ. Gonadal steroids and immunity, **Endocr. Rev.** 17; 369–384, 1996.

OPARA, E C. Oxidative stress. **Dm Disease-a-Month**, 52:183-98, 2006.

ORDWAY, G A, FARLEY, J T, DILLEY, G E, OVERHOLSER, J C, MELTZER, H Y, BALRAJ, E K, STOCKMEIER, C A, KLIMEK, V. Quantitative distribution of monoamine oxidase A in brainstem monoamine nuclei is normal in major depression. **Brain Res.**, 847(1):71-9, 1999.

Organização Mundial da Saúde (OMS) Depressão. **Ficha informativa dezembro/2016**. Disponível em <https://nacoesunidas.org/depressao-e-tema-de-campanha-da-oms-para-dia-mundial-da-saude-de-2017/>

OWENS, M J, NEMEROFF, C B. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. **Pharmacol. Rev.** 43, 425-473, 1991.

PALEGO L., BETTI L., ROSSI A., GIANNACCINI G. Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. **Journal of Amino Acids.**; 2016:8952520. 2016.

PANDEY GN, DWIVEDI Y, REN X, RIZAVI HS, ROBERTS RC, CONLEY RR. Cyclic AMP response element-binding protein in post-mortem brain of teenage suicide victims: specific decrease in the prefrontal cortex but not the hippocampus. **Int J Neuropsychopharmacol.** 10(5):621–9, 2007.

PANDYA, C.D., KUTIYANAWALLA, A., PILLAI, A. BDNF–TrkB signaling and neuroprotection in schizophrenia. **Asian J. Psychiatry.** 6, 22–28, 2013.

PARK, S E, LAWSON, M, DANTZER, R, KELLEY, K W, MCCUSKER, R H. Insulin-like growth factor-I peptides act centrally to decrease depression-like behavior of mice treated intraperitoneally with lipopolysaccharide. **Journal of Neuroinflammation.** 8:179, 2011.

PARK, S. J., S. C. LEE, S. H. HONG, AND H. M. KIM. Degradation of IkappaBalpha in activated RAW264.7 cells is blocked by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. **Cell Biol. Toxicol.** 18: 121–130, 2002.

PARK, S.E., DANTZER, R., KELLEY, K.W., MCCUSKER, R.H. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. **J. Neuroinflamm.** 8, 1742–2094, 2011.

PATKI, G, SOLANKI, N, ATROOZ, F, ALLAM, F, SALIM, S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Res.** 1539, 73-86, 2013.

PAWATE, S.; SHEN, Q.; FAN, F.; BHAT, N. R. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon-g. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, p. 540–551, 2004.

PEET, M, MURPHY, B, SHAY, J, HORROBIN, D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. **Biol. Psychiatry** 43 (5), 315–319, 1998.

PEINEAU S, BRADLEY C, TAGHIBIGLOU C, DOHERTY A, BORTOLOTTO ZA, WANG YT, COLLINGRIDGE GL. The role of GSK-3 in synaptic plasticity. **Br J Pharmacol** 153:S428–S437, 2008.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, SE; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 14,149-167, 1985.

PENNELL, L.M., GALLIGAN, C.L., FISH, E.N. Sex affects immunity. **J. Autoimmun.** 38, J282–J291, 201, 2012.

PENNELL, LM; GALLIGAN, CL; FISH, EN. Sex affects immunity. **Journal of Autoimmunity**, 38, J282-J291, 2012.

PENNINX, B W, KRITCHEYSKY, S B, YAFFE, K, NEWMAN, A B, SIMONSICK, E. M, RUBIN, S, FERRUCINI, L, HARRIS, T, PAHOR, M. Inflammatory markers and

depressed mood in older persons: results from the Health, Aging and Body Composition study. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 5, p.566-572, 2003.

PENNYPACKER, K. AP-1 transcription factors: short- and long-term modulators of gene expression in the brain. **Int Rev Neurobiol**. 42:169-97, 1998.

PEPELS, PP, BONGA, SE, BALM, PH. Bacterial lipopolysaccharide (LPS) modulates corticotropin-releasing hormone (CRH) content and release in the brain of juvenile and adult tilapia (*Oreochromis mossambicus*; Teleostei). **Exp Biol**. 207(Pt 25):4479–88, 2004.

PERERA TD, DWORK AJ, KEEGAN KA, THIRUMANGALAKUDI L, LIPIRA CM, JOYCE N, LANGE C, HIGLEY JD, ROSOKLIJA G, HEN R, SACKEIM HA, COPLAN JD. Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. **PLoS One**. 6(4):e17600, 2011.

PITYCHOUTIS, P M, NAKAMURA, K, TSONIS, P A, PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. **Neuroscience**, 159:1216–32, 2009.

PITYCHOUTIS, P M, PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Of depression and immunity: does sex matter? **Int. J. Neuropsychopharmacol**. 13, 675–689, 2010.

PITYCHOUTIS, PM; NAKAMURA, K; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. NEUROCHEMICAL AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN AN INFLAMMATORY MODEL OF DEPRESSION: SEX DIFFERENCES EXPOSED. **Neuroscience**, 159, 1216–1232, 2009.

PIVAC, N, KOZARIC-KOVACIC, D, GRUBISIC-ILIC, M, NEDIC, G, RAKOS, I, NIKOLAC, M, BLAZEV, M, MUCK-SELER, D. The association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met variants and psychotic symptoms in posttraumatic stress disorder. **World J. Biol. Psychiatry**, 13, 306-311, 2012.

POLAZZI E, CONTESTABILE A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. **Rev Neurosci**. 13:221–242, 2002.

POLAZZI, E, MONTI, B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. **Prog Neurobiol**., 92:293–315, 2010.

POLLAK, Y, YIRMIYA, R. Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for 'depression due to a general medical condition', immunotherapy and antidepressive treatment. **Int J Neuropsychopharmacol**., 5: 389–99, 2002.

POLTER, AM, LI, X. Glycogen synthase kinase-3 is an intermediate modulator of serotonin neurotransmission. **Front Mol Neurosci** 4:31, 2011.

POLTORAK M, FRYE MA, WRIGHT R, HEMPERLY JJ, GEORGE MS, PAZZAGLIA PL, ET AL. Increased neural cell adhesion molecule in the CSF of patients with mood disorder. **J Neurochem**. 66:1532-8, 1996.

PONOMAREV E. D., MARESZ K., TAN Y., DITTEL B. N. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. **J. Neurosci.** 27, 10714–10721, 2007.

PORSOLT, R D, ANTON, G, BLAVET, N, JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, 47, 379–391, 1978.

PORSOLT, R D, BERTIN, A, JALFRE, M. “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**. 51:291-4,1978.

PORSOLT, RD; BERTIN, A; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, 229, pp. 327-336, 1977.

PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**. 2003;463(1–3):3–33.

QI X, LIN W, LI J, LI H, WANG W, WANG D, SUN M. Fluoxetine increases the activity of the ERK-CREB signal system and alleviates the depressive-like behavior in rats exposed to chronic forced swim stress. **Neurobiol Dis**.31(2):278–285, 2008.

QIN, L., WU, X., BLOCK, M.L., LIU, Y., BREESE, G.R., HONG, J.S., KNAPP, D.J., CREWS, F.T. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia** 55 (5), 453–462, 2007.

QIN, L.; LI, G.; QIAN, X.; LIU, Y.; WU, X.; LIU, B. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. **Glia**, v. 52, p. 78–84, 2005.

QUAN, N, WHITESIDE, M, HERKENHAM, M. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Neuroscience**, v. 83, p. 281–293, 1998.

RAETZ, C R, WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Ann Rev Biochem.**, 71:635–700, 2002.

RAETZ, C R. Gram negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **FASEB.,J** 5:2652-2660, 1991.

RAGHAVENDRA, V., TANGA, F., RUTKOWSKI, M. D., AND DELEO, J. A. Anti-hyperalgesic and morphine-sparing actions of propentofylline following peripheral nerve injury in rats: mechanistic implications of spinal glia and proinflammatory cytokines. **Pain**. 104, 655–664, 2003b.

RAISON C L, CAPURON L, MILLER A H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol.**, 27: 24–31, 2006.

RAISON, C L, LOWRY, C A, ROOK, G A. Inflammation, sanitation, and consternation: loss of contact with coevolved, tolerogenic microorganisms and the pathophysiology and treatment of major depression. **Arch. Gen. Psychiatry** 67 (12), 1211–1224, 2010.

RAISON, C, CAPURON, L, MILLER, A. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol.**, Jan; 27(1):24-31, 2006.

RAMMAL, H., BOUAYED, J., YOUNOS, C., SOULIMANI, R. The impact of high anxiety levels on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. **Eur. J. Pharmacol.** 589, 173–175, 2008a.

RANSOHOFF, RM; BROWN, MA. Innate immunity in the central nervous system. **J clin. Invest.**, 122, pp. 1164-1171, 2012.

RAYEN I, VAN DEN HOVE DL, PRICKAERTS J, STEINBUSCH HW, PAWLUSKI JL. Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence. **PLoS One.** 6(9):e24003, 2011.

REAGAN-SHAW, S; NIHAL, M; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J.** Mar;22(3):659-61, 2008.

REASONER DK, HINDMAN BJ, DEXTER F, SUBIETA A, CUTKOMP J, SMITH T. Doxycycline reduces early neurologic impairment after cerebral arterial air embolism in the rabbit. **Anesthesiology** 87:569–576, 1997.

REDFORD, E.J.; KAPOOR, R.; SMITH, K.J. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. **Brain** v.120, p.2149–2157, 1997.

REICHENBERG, A, YIRMIYA, R, SCHULD, A, KRAUS, T, HAACK, M, MORAG, A, POLLMÄCHER, T. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbance in humans. **Arch Gen Psychiatry**, 58:445–52, 2001.

REN, X., DWIVEDI, Y., MONDAL, A.C., PANDEY, G.N. Cyclic-AMP response element binding protein (CREB) in the neutrophils of depressed patients. **Psychiatry Res.** 185, 108–112, 2011.

REUS GZ, VIEIRA FG, ABELAIRA HM, MICHELS M, TOMAZ DB, DOS SANTOS MA, CARLESSI AS, NEOTTI MV, MATIAS BI, LUZ JR, DAL-PIZZOL F, QUEVEDO J (2014) MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. **J Psychiatr Res.** 55:15–21, 2014.

RÉUS, G.Z., ABELAIRA, H.M., MACIEL, A.L., DOS SANTOS, M.A.B., CARLESSI, A.S., STECKERT, A.V., FERREIRA, G.K., DE PRÁ, S.D., STRECK, E.L., MACÊDO, D.S., QUEVEDO, J. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. **Metab. Brain Dis.** 30, 545–553, 2014.

RIAZI, K, GALIC, M A, KUZMISKI, J B, HO, W, SHARKEY, K A, SHARKEY, K A, PITTMAN, Q J. Microglial activation and TNF-alpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 15151– 17156, 2008.

RIBEIRO, D.E; MAIOLINI, V.M; SONCINI,R; RODRIGUES, J.A; ELIAS, L.L.K; VILELA, F.C; PAIVA, G.P. Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 103, 533-540, 2012.

RIDNOUR, L. A., ISENBERG, J. S., ESPEY, M. G., THOMAS, D. D., ROBERTS, D. D., WINK, D. A. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 102, 13147–13152, 2005.

RIDNOUR, L. A., THOMAS, D. D., MANCARDI, D., ESPEY, M. G., MIRANDA, K. M., PAOLOCCI, N. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biol. Chem.**, 385, 1–10, 2004.

RODRIGUES SM, SCHAFE GE, LEDOUX JE. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. **Neuron**. 44:75–91, 2004.

ROMANOWSKI, B, TALBOT, M, STADNYK, M. Em comparação com a minociclina doxiciclina no tratamento de uretrite não gonocócica e cervicite mucopurulenta. **Ann. Intern. Med.**, v. 119, p. 16-22, 1993.

ROMEO, H E, TIO, D L, RAHMAN, S U, CHIAPPELLI, F, TAYLOR, A N. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. **J. Neuroimmunol.**, v.115, p. 91– 100, 2001.

ROQUE, S; CORREIA-NEVES, M; MESQUITA, AR; PALHA, JA; SOUSA, N. Interleukin-10: a key cytokine in depression? **Cardiovasc Psychiatry Neurol**, 2009, p. 187894, 2009.

ROSA AO, KASTER MP, BINFARE RW, MORALES S, MARTIN-APARICIO E, NAVARRO-RICO ML, MARTINEZ A, MEDINA M, GARCIA AG, LOPEZ MG, RODRIGUES AL. Antidepressant-like effect of the novel thiazolidinone NP031115 in mice. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry** 32(6):1549–1556, 2008.

ROSE S, MELNYK S, PAVLIV O, BAI S, NICK TG, FRYE RE, JAMES SJ. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. **Transl Psychiatry**. 2:e134, 2012.

ROSE, J.M, DAFRE, A.L. RODRIGUES, A.L. Antidepressant-like responses in the forced swimming test elicited by glutathione and redox modulation **Behav Brain Res**. 253, 165-172, 2013.

ROTHSTEIN, J D, PATEL, S, REGAN, M R, HAENGGELI, C, HUANG, Y H, BERGLES, D E. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing

glutamate transporter expression. **Nature**, 433:73–77, 2005.

ROUMESTAN, C., MICHEL, A., BICHON, F., PORTET, K., DETOC, M., HENRIQUET, C., et al. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. **Respir. Res.** 8, 35, 2007.

RUSH AJ, WISNIEWSKI SR, ZISOOK S, FAVA M, SUNG SC, HALEY CL, CHAN HN, GILMER WS, WARDEN D, NIERENBERG AA, BALASUBRAMANI GK, GAYNES BN, TRIVEDI MH, HOLLON SD. Is prior course of illness relevant to acute or longer-term outcomes in depressed out-patients? A STAR\*D report. **Psychol Med.** 42:1131–1149, 2012.

RUSSO-NEUSTADT, A. Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders. **Semin. Clin. Neuropsychiatry**, 8, 109-118, 2003.

RUSSO, S.J., NESTLER, E.J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nat. Rev. Neurosci.** 14, 609–25, 2013.

RYGULA R, ABUMARIA N, FLUGGE G, FUCHS E, RUTHER E, HAVEMANN-REINECKE U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. **Behav Brain Res.** 162:127–134, 2005.

SAAVEDRA, A, BALTAZAR, G, DUARTE, EP. Driving GDNF, expression: the green and the red traffic lights. **Prog Neurobiol.**, 86:186–215, 2008.

SANACORA, G, ZARATE, C A, KRYSTAL, J H, MANJI, H K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 7, p. 426-437, 2008.

SANTA-CECILIA, FV; SOCIAS, B; SEPULVEDA-DIAZ, JE; ACUN, L; SILVA, RL; MICHEL, PP; DEL-BEL, E; CUNHA, T; RAISMAN-VOZARI, R. Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. **Neurotox Res.** 29:447–459, 2016.

SAPOLSKY RM, MEANEY MJ, MCEWEN BS. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III . Negative-feedback regulation. **Brain Res.** 350: 169-173, 1985.

SARANDOL A, SARANDOL E, EKER SS, ERDINC S, VATANSEVER E, KIRLI S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Hum Psychopharmacol.** 22(2):67–73, 2007.

SARTER, M, PARIKH, V, HOWE, W M. nAChR agonist-induced cognition enhancement: integration of cognitive and neuronal mechanisms. **Biochem. Pharmacol.**, v. 10, p. 658–667, 2009.

SAYRE, L. M., SMITH, M. A., PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Curr. Med. Chem.**, 8, 721–738, 2001.

SCHAUENSTEIN, K; RINNER, I; ELSNER, P; LIEBMANN, P; HASS, HS; WOLFLER, A; STEVEN-SON, R; WESTERMANN, J; COHEN, RL; CHAMBERS, DA. The dialogue between the brain and the immune system involves not only the HPA-axis. **Z. Rheumatol.** 59,49–53, 2000.

SCHIEPERS, O J, WICHERS, M C, MAES, M. Cytokines and major depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 29, n. 2, p. 201–217, 2005.

SCHILDKRAUT JJ: The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, 122(5):509-522, 1965.

SCHMIDT, H D, DUMAN, R S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. **Neuropsychopharmacology**, 35, 2378-2391, 2010.

SCHMIDT, H D, DUMAN, R S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behav. Pharmacol.** 18, 391-418, 2007.

SCHNEIDER, A., MARTIN-VILLALBA, A., WEIH, F., VOGEL, J., WIRTH, T., SCHWANINGER, M. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. **Nat. Med.** 5, 554–559, 1999.

SCHNYDRIG S, KORNER L, LANDWEER S, ERNST B, WALKER G, OTTEN U, KUNZ, D. Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. **Neuro Lett**, 429:69–73, 2007.

SCHUCH, J.J.J., ROEST, A.M., NOLEN, W.A., PENNINX, B.W.J.H., DE JONGE, P. Gender differences in major depressive disorder: Results from the Netherlands study of depression and anxiety. **J. Affect. Disord.** 156, 156–163, 2014.

SEDLAK, J, HANUS, L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. **Endocrinol Exp.**, Jun;16(2):103-9, 1982.

SEIDEL A, AROLT V, HUNSTIGER M, RINK L, BEHNISCH A, KIRCHNER H. Cytokine production and serum proteins in depression. **Scandinavian Journal of Immunology**, 41:534-8, 1995.

SELCHER JC, NEKRASOVA T, PAYLOR R, LANDRETH GE, SWEATT JD. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. **Learning and Memory.** 8:11–19, 2001.

SELEK S, SAVAS HA, GERGERLIOGLU HS, BULBUL F, UZ E, YUMRU M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. **J Affect Disord.** 107(1–3):89–94, 2008.

SENS, J, SCHNEIDER, E, MAUCH, J, SCHAFFSTEIN, A, MOHAMED, S, FASOLI, K, SAURINE, J, BRITZOLAKI, A, THELEN, C, PITYCHOUTIS, PM.

Lipopolysaccharide administration induces sex-dependent behavioural and serotonergic neurochemical signatures in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 153,168–181, 2017.

SHAN, S., HONG-MIN, T., YI, F., JUN-PENG, G., YUE, F., YAN-HONG, T., YUN-KE Y, WEN-WEI L, XIANG-YU W, JUN M, GUO-HUA W, YA-LING H, HUA-WEI L, DING-FANG C. New evidences for fractalkine/CX3CL1 involved in substantia nigral microglial activation and behavioral changes in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging** 32, 443–458, 2011.

SHAYWITZ AJ, GREENBERG ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu Rev Biochem.** 68:821–861, 1999.

SHELTON, RC, CLAIBORNE, J, SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M, REDDY, R, ASCHNER, M, LEWIS, DA, MIRNICS, K. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. **Mol Psychiatry**, 16:751–62, 2011.

SHIRAYAMA, Y., CHEN, A.C., NAKAGAWA, S., RUSSELL, D.S., DUMAN, R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J. Neurosci.** 22, 3251–3261, 2002.

SHUMANN, RR, LEONG, SR, FLAGGS, GW, GRAY, PW, WRIGHT, SD, MATHISON, JC, TOBIAS, PS, ULEVITCH, RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. **Science**,1249-1429, 1990.

SILVA, JA. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 876,102–118, 1999.

SILVERSTEIN, B. Gender differences in the prevalence of somatic versus pure depression: a replication. **Am. J. Psychiatry**, 159, 1051-1052, 2002.

SIMON, H.U., HAJ-YEHIA, A., LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis** 5, 415–418, 2000.

SLUZEWSKA, A, RYBAKOWSKI, J, BOSMANS, E, SOBIESKA, M, BERGHMANS, R, MAES, M. Indicators of immune activation in major depression. **Psychiatry Res.**, v. 64, n. 3, p. 161-167, 1996.

SMITH, K, LEYDEN, JJ. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. **Clinical Therapeutics**, 27:1329-42, 2005.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Med. Hypotheses**, v. 35, p. 298– 306, 1991.

SNYDER JS, SOUMIER A, BREWER M, PICKEL J, CAMERON HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**. 476(7361):458–61, 2011.

SOCZYNSKA JK, MANSUR RB, BRIETZKE E, SWARDFAGER W, KENNEDY SH, WOLDEYOHANNES HO, POWELL AM, MANIERKA MS, MCINTYRE RS. Novel therapeutic targets in depression: minocycline as a candidate treatment. **Behavioural Brain Research**. 235:302-17, 2012.

SOLOMON, A, ROSENBLATT, M, MONROY, D, LOKESHWAR, S, PFLUGFELDER, C. Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 41, p. 2544–2557, 2000.

SONG, C, LIN, A, BONACCORSO, S, HEIDE, C, VERKERK, R, KENIS, G, BOSMANS, E, SCHARPE, S, WHELAN, A, COSYNS, P, JONGH, R, MAES, M. The inflammatory response system and the availability of plasma tryptophan in patients with primary sleep disorders and major depression. **J. Affect Disord.**, v. 49, n. 3, p. 211–219, 1998.

SOUICY, G., BOIVIN, G., LABRIE, F., RIVEST, S. Estradiol Is Required for a Proper Immune Response to Bacterial and Viral Pathogens in the Female **Brain**. **J. Immunol**. 174, 6391–6398, 2005.

SPICKETT CM, JERLICH A, PANASENKO OM, ARNHOLD J, PITT AR, STELMASZYŃSKA T, SCHAUR RJ. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. **Acta Biochim Pol**; 47:889–99, 2000.

SPINEDI, E, SALAS, M, CHISARI, A, PERONE, M, CARINO, M, GAILLARD, RC. Sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to inflammatory and neuroendocrine stressors. Evidence for a pituitary defect in the autoimmune disease-susceptible female Lewis rat. **Neuroendocrinology**, 60, 609–617, 1994.

SPULBER S, EDOFF K, HONG L, MORISAWA S, SHIRAHATA S, CECCATELLI S. Molecular hydrogen reduces LPS-induced neuroinflammation and promotes recovery from sickness behaviour in mice. **PLoS One**;7:e42078, 2012.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Front Biosci.**, 10, 1881–1896, 2005.

STRASSER B., GOSTNER J. M., FUCHS D. Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**;19(1):55–61, 2016.

SU, F; YI, H; XU L; ZHANG, Z. Fluoxetine and s-citalopram inhibit m1 activation and promote m2 activation of microglia Invitro. **Neuroscience** 294, 60–68, 2015.

SUBLETTE ME, POSTOLACHE TT. Neuroinflammation and depression: the role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) as a Molecular pathway. **Psychosomatic Medicine**. 74:668-72, 2012.

SUGIYAMA, K., MUROI, M., TANAMOTO, K. A novel TLR4-binding peptide that inhibits LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B and in vivo toxicity. **Eur. J. Pharmacol.**, 594, 152-156, 2008.

SUGIYAMA, K., MUROI, M., TANAMOTO, K., NISHIJIMA, M. AND SUGITA-KONISHI, Y. Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. **Toxicol. Lett.**, 192, 150-154, 2010.

SULAKHIYA, K; KUMAR, JANGRA, A, DWIVEDI, S; HAZARIKA, NK; BARUAH, CC; LAHKAR, M. Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice, **Eur. J. Pharmacol.**, 744;124–131, 2014.

SUMEGI A. Domino principle – monoamines in bottom-view. **Neuropsychopharmacol Hung**,10(3):131-40, 2008.

SWEATT JD. The neuronal MAP kinase cascade: A biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **J Neurochem**. 76:1–10, 2001.

SWEITZER, S M, COLBUM, R W, RUTKOWSKI, M, DELEO, J A. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat. **Brain Res.**, v. 829, p. 209–221, 1999.

SWIERGIEL, A.H., DUNN, AJ. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 86,651–659, 2007.

SWIERGIEL, AH; BURUNDA, T; PATTERSON, B. Endotoxin- and interleukin-1-induced hypophagia are not affected by noradrenergic, dopaminergic, histaminergic and muscarinic antagonists. **Pharmacol Biochem Behav**. 63:629-637, 1999.

TALIAZ D, STALL N, DAR DE, ZANGEN A. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. **Mol Psychiatry**. 15(1):80–92, 2010.

TANCREDI, V, D'ARCANGELO, G, GRASSI, F, TARRONI, P, PALMIERI, G, SANTONI, A, EUSEBI, F. Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. **Neurosci. Lett.**, v. 146, p. 176–178, 1992.

TAO, Y., LI, L., JIANG, B., FENG, Z., YANG, L., TANG, J., FENG H, CHEN Z, ZHU G. Cannabinoid receptor-2 stimulation suppresses neuroinflammation by regulating microglial M1/M2 polarization through the cAMP/PKA pathway in an experimental GMH rat model. **Brain Behav. Immun**. 58, 118–129, 2016.

TARR, AJ, MCLINDEN, KA, KRANJAC, D, KOHMAN, RA, AMARAL, W, BOEHM GW. The effects of age on lipopolysaccharide-induced cognitive deficits and interleukin-1 expression. **Behav Brain Res**, 217:481–5, 2011.

TAYLOR JR, BIRNBAUM S, UBRIANI R, ARNSTEN AFT. Activation of cAMP-dependent protein kinase A in prefrontal cortex impairs working memory performance. **J Neurosci** 19:1–5, 1999.

TAYLOR, G.T., FARR, S., KLINGA, K., WEISS, J. Chronic fluoxetine suppresses circulating estrogen and the enhanced spatial learning of estrogen-treated ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**. 29, 1241–1249, 2004.

THANNICKAL, V. J., FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, 279, L1005–L1028, 2000.

THOMAS M, ASHIZAWA T, JANKOVIC J. Minocycline in Huntington's disease: a pilot study. **Mov Disord**. 19:692–695, 2004.

THOMAS, A.J., DAVIS, S., MORRIS, C., JACKSON, E., HARRISON, R., O'BRIEN, J.T. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. **Am. J. Psychiatry**. 162, 175–177, 2005.

THOME J, HENN FA, DUMAN RS. Cyclic AMP response element-binding protein and depression. **Expert Rev Neurother**. 2(3):347–54, 2002.

THOME, J., SAKAI, N., SHIN, K., STEFFEN, C., ZHANG, Y.J., IMPEY, S., STORM, D., DUMAN, R.S. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. **J. Neurosci**. 20, 4030–4036, 2000.

THOMSON, LM, SUTHERLAND, RJ. Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation. **Brain Res Bull**, 67:24–9, 2005.

TIKKA, T.M.; KOISTINAHO, J.E. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. **J. Immunol.**, v. 166, p. 7527–7533, 2001.

TJADERHANE, L, OTAKAINEN, T, KINNUNEN, S, AHONEN, M, SALO, T. The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. **Int. Endodontic J.**, v. 40 n. 4, p. 282-289, 2007.

TOMAZ, VS, CORDEIRO, RC, COSTA, AM, DE LUCENA, DF, NOBRE JÚNIOR, HV, DE SOUSA, FC, VASCONCELOS, SM, VALE, ML, QUEVEDO, J, MACÊDO, D. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**. May 30;268:236-46, 2014.

TONELLI, L.H., HOLMES, A., POSTOLACHE, T.T., 2008. Intranasal immune challenge induces sex-dependent depressive-like behavior and cytokine expression in the brain. **Neuropsychopharmacology**. 33 (5), 1038–1048, 2008.

TRIVEDI, MH, RUSH, AJ, WISNIEWSKI, SR, NIERENBERG, AA, WARDEN, D, RITZ, L, NORQUIST, G, HOWLAND, RH, LEBOWITZ, B, MCGRATH, PJ, SHORES-WILSON, K, BIGGS, MM. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. **Am. J. Psychiatry**, 163 (1), 28–40, 2006.

TUCKER, PS; SCANLAN, AT; DALBO, VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2015, Article ID 806358, 8 pages, 2015.

TUGLU, C, KARA, SH, CALIYURT, O, VARDAR, E, ABAY, E. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. **Psychopharmacology (Berl)**,170:429–33, 2003.

TYLER CR, SOLOMON BR, ULIBARRI AL, ALLAN AM. Fluoxetine treatment ameliorates depression induced by perinatal arsenic exposure via a neurogenic mechanism. **Neurotoxicology**. 44:98–109, 2014.

TYNAN RJ, WEIDENHOFER J, HINWOOD M, CAIRNS MJ, DAY TA, WALKER FR. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. **Brain Behavior and Immunity**. 26:469-79, 2012.

UEKERMANN, J. Social cognition in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 34, p. 734–743, 2010.

UHER, R, TANSEY, KE, DEW, T, MAIER, W, MORS, O, HAUSER, J, DERNOVSEK, MZ, HENIGSBERG, N, SOUERY, D, FARMER, A, MCGUFFIN, P. An inflammatory biomarker as a differential predictor of outcome of depression treatment with escitalopram and nortriptyline. **Am. J. Psychiatry** 171, 1278-1286, 2014.

ULMANEN I., PERÄNEN J., TENHUNEN J., et al. Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. **European Journal of Biochemistry**.;243(1-2):452–459, 1997.

VADODARIA, KC, JESSBERGER, S. Functional neurogenesis in the adult hippocampus: then and now. **Front Neurosci**. 8:55, 2014.

VALE, W, SPIESS, J, RIVIER, C, RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta- endorphin. **Science** 213, 1394-1397, 1981.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol**. 39, 44–84, 2007.

VALKO, M., MORRIS, H., MAZUR, M., RAPTA, P., BILTON, R. F. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? **Biochim. Biophys. Acta**, 1527, 161–166, 2001.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, 160, 1–40, 2006.

VALLIERES, L, CAMPBELL, IL, GAGE, FH, SAWCHENKO, PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin6. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 2, p. 486-492, 2002.

VAN DER MEER, M J, SWEEP, C G, RIJNKELS, C E, PESMAN, G J, TILDERS, F J, KLOPPENBORG, P W, HERMUS, A R. Acute stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by IL-1 beta, TNF alpha and IL-6: a dose response study. **J. Endocrinol. Investig**, 19, 175-182, 1996.

VAN PRAAG, H M, KORF, J. Endogenous depression with and without disturbances of 5-hydroxytryptamine metabolism: a biochemical classification? **Psychopharmacol**, 19, 148-152, 1971.

VANWEST, D.; MAES, M. Activation of the inflammatory response system: a newlook at the etiopathogenesis of major depression. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 20, n. 1/2, p. 11–17, 1999.

VELLOSA, J. C. R. PARABOCZ, GC; MANENTE, FA; RIBAS, JT; LIMA, LW. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305–312, 2013.

VERTHELYI, D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. **Int. Immunopharmacol.** 1, 983–93, 2001.

VIDEBECH P, RAVNKILDE B. Hippocampal volume and depression: A meta-analysis of MRI studies. **Am J Psychiatry**. 2004; 161: 1957-1966, 2004.

WADE, A, LEMMING, O, BANG, HEDEGAARD K. Escitalopram 10 mg/day is effective and well tolerated in a placebo-controlled study in depression in primary care. **Int Clin Psychopharmacol**. 17:95–102, 2002.

WALKER AK, RIVERA PD, WANG Q, CHUANG JC, TRAN S, OSBORNE-LAWRENCE S, ESTILL SJ, STARWALT R, HUNTINGTON P, MORLOCK L, NAIDOO J, WILLIAMS NS, READY JM, EISCH AJ, PIEPER AA, ZIGMAN JM. The P7C3 class of neuroprotective compounds exerts antidepressant efficacy in mice by increasing hippocampal neurogenesis. **Mol Psychiatry**. 20(4):500–8, 2015.

WALKO, M; LEIBFRITZ, D; MONCOL, J; CRONIN, MTD; MAZUR, M; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39, 44–84, 2007.

WALLACE, D.L.; HAN, M.H.; GRAHAM, D.L.; GREEN, T.A.; VIALOU, V.; INIGUEZ, S.D.; CAO, J.L.; KIRK, A.; CHAKRAVARTY, S.; KUMAR, A.; *ET AL*. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. **Nat. Neurosci.** 12, 200–209, 2009.

WALTER, L, NEUMANN, H. Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. **Semin Immunopathol**, 31:513–25, 2009.

WANG Y, LAWSON MA, DANTZER R, KELLEY KW. LPS-induced indoleamine 2,3-

dioxygenase is regulated in an interferon-gamma-independent manner by a JNK signaling pathway in primary murine microglia. *Brain Behavior and Immunity*. 24:201-9, 2010.

WANG, H, BROWN, J, MARTIN, M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. **Cytokine** 53:130–140, 2011a.

WANG, P.G; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. **Chem. Rev.**, v.102, p.1091-1134, 2002.

WARNER-SCHMIDT, JL; DUMAN, RS. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. **Proc Natl Acad Sci USA**, 104:4647–4652, 2007.

WATERHOUSE EG, AN JJ, OREFICE LL, BAYDYUK M, LIAO GY, ZHENG K, LU B, XU B. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. **J Neurosci Off J Soc Neurosci**. 32(41):14318–30, 2012.

WATKINS, L.R. Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. **Brain Res.**, v. 639, p. 283– 299, 1994.

WEBSTER, GF, TOSO SM. Inhibition of a model of in vitro granuloma formation by tetracyclines and ciprofloxacin: involvement of protein kinase C. **Arch. Dermatol.**, v. 130, p. 748–752, 1994.

WEICH, S, SLOGGETT, A, LEWIS, G. Social roles and the gender difference in rates of the common mental disorders in Britain: a 7- year, population-based cohort study. **Psychol Med** 31(6):1055–1064, 2001.

WEINSTEIN, Y., RAN, S., SEGAL, S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. **J. Immunol**. 132, 656–61, 1984.

WEISSMAN, MM, OLFSON, M. Depression in women: implications for health care research. **Science** 269:799–801, 1995.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. The selection and use of essential medicines. Report of the 21st WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines. **Executive Summary**. 27-31 March, 2017.

WICHMANN, M W, AYALA, A, CHAUDRY, I H. Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. **AJP - Cell Physiology**, 273:C1335–1340, 1997.

WIECZOREK, M, SWIERGIEL, AH, POURNAJAFI-NAZARLOO, H, DUNN, AJ. Physiological and behavioral responses to interleukin-1beta and LPS in vagotomized mice. **Physiol. Behav.**, v. 85, p. 500–511, 2005.

WIESNER P, CHOI SH, ALMAZAN F, BENNER C, HUANG W, DIEHL CJ, GONEN A, BUTLER S, WITZTUM JL, GLASS CK, MILLER YI. Low doses of lipopolysaccharide and minimally oxidized low-density lipoprotein cooperatively activate macrophages via nuclear factor kappaB and activator protein-1 possible mechanism for acceleration of atherosclerosis by subclinical endotoxemia. **Circ Res.**;107:56–65, 2010.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacology and Therapeutics**, 45, 1990.

WOHLEB ES, HANKE ML, CORONA AW, POWELL ND, STINER LM, BAILEY MT, NELSON RJ, GODBOUT JP, SHERIDAN JF. Beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. **The Journal of Neuroscience**. 31: 6277-88, 2011.

WOLF, F, BRÜNE, M, ASSION, HJ. Theory of mind and neurocognitive functioning in patients with bipolar disorder. **Bipolar Disord**,12: 657–666, 2010.

WOOD S. K., VALENTINO R. J. The brain norepinephrine system, stress and cardiovascular vulnerability. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**;74(Pt B):393-400, 2016.

WOOD, SK, WOODS, JH. Corticotropin-releasing factor receptor-1: a therapeutic target for cardiac autonomic disturbances. **Expert Opin. Ther. Targets** 11, 1401-1413, 2007.

WURFELL, MM, HAILMAN, E, WRIGHT, SD. Soluble CD14 acts as shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. **J Exp Med.**,181:1743-1754, 1995.

XIA Z, DEPIERRE JW, NASSBERGER L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. **Immunopharmacology** 34:27–37, 1996.

XU, H., CZERWINSKI, P., XIA, N., FORSTERMANN, U., LI, H. Downregulation of BDNF Expression by PKC and by TNF-alpha in human endothelial cells. **Pharmacology**, 96, 1–10, 2015.

XU, H.; CHEN, Z.; HE, J.; HAIMANOT, S.; LI, X.; DYCK, L.; LI, X.M. Synergetic effects of quetiapine and venlafaxine in preventing the chronic restraint stress-induced decrease in cell proliferation and BDNF expression in rat hippocampus. **Hippocampus**. 16, 551–559, 2006.

XU, N; TANG, XH; PAN, W; ZHANG, GF; JI, MH; YANG, JJ; ZHOU, MT, ZHOU, ZQ. Spared Nerve Injury Increases the Expression of Microglia M1 Markers in the Prefrontal Cortex of Rats and Provokes Depression-Like Behaviors. **Front Neurosci**. 11:209, 2007.

YAMADA S, YAMAMOTO M, OZAWA H, RIEDERER P, SAITO T. Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem

orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. **J Neural Transm.** 110(6):671–80, 2003.

YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., HOSHINO, K., KAISHO, T., SANJO, H., TAKEUCHI, O., SUGIYAMA, M., OKABE, M., TAKEDA, K., AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, 301, 640-643, 2003.

YAP, YW, WHITEMAN, M, CHEUNG, NS. Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? **Cell Signal** 2007;19:219–28, 2007.

YI C, ZHANG Z, WANG W, ZUG C, SCHLUESENER HJ. Doxycycline attenuates peripheral inflammation in rat experimental autoimmune neuritis. **Neurochemical Research.** 36:1984-90, 2011.

YIM, CW, FLYNN, NM, FITZGERALD, FT. Penetration of oral doxycycline into the cerebrospinal fluid of patients with latent or neurosyphilis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 28:347-8, 1985.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Res.** 711:163–74, 1996.

YIRMIYA, R., GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain Behav. Immun.** 25, 181–213, 2011.

YRJANHEIKKI J, KEINANEN R, PELLIKKA M, HOKFELTT , KOISTINAHO J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:15769–15774, 1998.

YU, B, HAILMAN, E, WRIGHT, SD. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyse of phospholipids. **J Clin Invest.**, 99:315-324, 1997.

YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v.379, p.201-210, 1997.

ZHANG K, XU H, CAO L, LI K, HUANG Q. Interleukin-1beta inhibits the differentiation of hippocampal neural precursor cells into serotonergic neurons. **Brain Research.**1490:193-201, 2013.

ZHANG R, ZHAO M, JI HJ, YUAN YH, CHEN NH. Study on the dynamic changes in synaptic vesicle-associated protein and axonal transport protein combined with LPS neuroinflammation model. **ISRN Neurol**, 2013.

ZHANG, D, HU, X, QIAN, L, WILSON, B, LEE, C, FLOOD, P, LANGENBACH, R, HONG, J S. Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation in vitro. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, n. 1, p. 64–70, 2009.

ZHANG, JC, YAO, W, HASHIMOTO, K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)–TrkB signaling in inflammation-related depression and potential therapeutic targets. **Curr Neuropharmacol.**14:721–731, 2016.

ZHANG, KZ, KAUFMAN, RJ. The unfolded protein response ea stress signaling pathway critical for health and disease. **Neurology**, 66:S102-9, 2006.

ZHANG, X; SONG, Y; BAO, T; YU, M; XU, M; GUO, Y; WANG, Y; ZHANG, C; ZHAO, B. Antidepressant-like effects of acupuncture involved the ERK signaling pathway in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 16:380, 2016.

ZHANG, Y, LIU, L, PENG, YL, LIU, YZ, WU, TY, SHEN, XL, ZHOU, JR, SUN, DY, HUANG, AJ, WANG, X, WANG, YX, JIANG, CL. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. **CNS Neurosci. Ther**, 20:119–124, 2014.

ZHOU R, Y. A.S.; MENU, P.; TSCHOPP, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, p. 221–225, 2011.

ZORRILLA, EP, LUBORSKY, L, MCKAY, JR, ROSENTHAL, R, HOULDIN, A, TAX, A, MCCORKLE, R, SELIGMAN, DA, SCHMIDT, K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. **Brain Behav Immun**, 15:199–226, 2001.

ZOU, J. Y.; CREWS, F. T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: Neuroprotection by NF kappa B inhibition. **Brain Research**, v. 1034, p. 11–24, 2005.

ZUNSZAIN, P. A.; HEPGUL, N.; PARIANTE, C. M. Inflammation and Depression. **Curr. Top. Behav. Neurosci.**, v. 14, p. 135-151, 2013.



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal -- CEPA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ Determinação dos efeitos protetores e terapeuticos na associação de antimicrobianos e antidepressivos no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de lipopolissacarídeos em camundongos”, protocolo nº 20/114, sob responsabilidade Danielle Macedo Gaspar , que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 30 de junho de 2015.

Vigência do projeto	01/10/2014 a 01/07/2016
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss heterogênico
Nº de Animais	244
Peso/Idade	20g
Sexo	122 Machos / 122 Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 15 de julho de 2015

Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734