



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

VIVIANE DE SOUSA TOMAZ

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE ANTIDEPRESSIVOS DE
DIFERENTES CLASSES E DE INIBIDORES DAS ISOFORMAS DE
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO
POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

FORTALEZA - CEARÁ

2019

VIVIANE DE SOUSA TOMAZ

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE ANTIDEPRESSIVOS DE
DIFERENTES CLASSES E DE INIBIDORES DAS ISOFORMAS DE
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NO MODELO DE DEPRESSÃO
INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

FORTALEZA - CEARÁ

2019

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)

- T615e Tomaz, Viviane de Sousa.
EFEITO IMUNOMODULADOR DE ANTIDEPRESSIVOS DE DIFERENTES CLASSES E DE INIBIDORES DAS ISOFORMAS DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO / Viviane de Sousa Tomaz. – 2019.
121 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Danielle Macêdo Gaspar.
1. Lipopolissacarídeo. 2. Depressão. 3. Óxido Nítrico Sintase. 4. Citocinas. 5. Inflamação. I. Título.
CDD 616.9
-

VIVIANE DE SOUSA TOMAZ

**ESTUDO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE ANTIDEPRESSIVOS DE
DIFERENTES CLASSES E DE INIBIDORES DAS ISOFORMAS DE ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Médica.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
URCA
Membro da Banca

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Sampaio Assreuy
UECE
Membro da Banca

Prof.^a Dr.^a Edna Maria Camelo Chaves
UECE
Membro da Banca

Prof.^a Dr.^a Ticiane Monteiro Abreu
UNIGRANDE
Membro da Banca

Dedico este trabalho a minha gatinha Morgana, eterna filhinha que foi para outro plano, mas continua viva no coração da mamãe.

E as minhas Sobrinhas, Verônica Tomaz e Laisa Tomaz, espero um dia vê-las ingressar e concluir um Doutorado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a razão da nossa existência, minha fortaleza e meu refúgio nas horas difíceis;

À minha mãe, pessoa mais importante da minha vida, por ter-me amado incondicionalmente, por edificar a nossa casa, por querer sempre o melhor e, neste caso, agradeço principalmente por ter-me me incentivado e sempre acreditado que eu conseguiria. Mamãe, você me inspira em tudo e é uma das razões de eu estar aqui no dia de hoje;

À minha orientadora, Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar, exemplo de pesquisadora, pelos ensinamentos, apoio e disponibilidade com que orientou este trabalho, como também, por acreditar em mim como aluna, e ter pensado junto com comigo em outros projetos, até que chegássemos a este, dando suporte e incentivo para que ele se tornasse viável;

À Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves, por ter me incentivado e orientado ainda na graduação. Pessoa a quem devo essa conquista, me ensinou a trilhar os meus primeiros passos na pesquisa. A história de gratidão e respeito é muito longa e são poucas linhas para expressar-me. Por ser essa pessoa especial, doce, serena, amiga, incentivadora, generosa e ser meu referencial de Enfermeira, Professora e Pesquisadora.

Adriano Maia, pela companhia, orientação, participação fundamental na execução dos experimentos, encorajamento emocional, fundamentais para me fazer continuar seguindo durante as várias dificuldades ao longo destes cinco anos;

Aos membros da banca, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes. Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy, Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves e Profa. Dra. Ticiania Monteiro Abreu, por aceitarem gentil e prontamente o nosso convite

Ao meu namorado, Valmirlan Fechine, por ser a pessoa que está comigo em todos os momentos. Na vida acadêmica, por ter sempre me impulsionado a querer sempre mais. Enfim, por ter compreendido esse momento de ausência, com tranquilidade e palavras de incentivo;

À Rafaella Cordeiro, companheira de todas as horas, sempre disposta e disponível a ajudar, ouvir e orientar. Meu sincero agradecimento pela sua participação efetiva na minha vida como um todo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica;

Aos professores Dr. José Eduardo Honório e Dra. Cinthia Freitas, pelas contribuições e participação na banca de qualificação;

À Michele Verde-Ramo e Palôma Jucá por serem as melhores IC's do planeta, vocês foram essenciais para conclusão deste trabalho;

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – UFC, por ser uma coordenadora sensível, conseguindo mediar os problemas do aluno e a necessidade do cumprimento de prazos;

As amigas Larissa Moraes, Fernanda Yvelize, Aline Lemos, Evangelina Crisóstomo e Juliana Granjeiro, que estiveram comigo, me acolhendo com amor e ternura no decorrer dos últimos anos;

À Francina Cirino, pelo incentivo, carinho e por ser minha fã número um.

Aos Médicos Lanese Medeiros (Reumatologista), Carlos Gustavo Ipsen (Anestesiologista) e Luiz Dantas Filho (Otorrinolaringologista e Acumputurista), por aliviarem minhas dores incessantes, pensando e estudando as mais diversas terapêuticas, somente com o intuito do meu bem-estar, sem vocês eu não teria conseguido;

Às Enfermeiras que compõem o alojamento conjunto do Hospital Geral Dr. César Calls, em especial, Cacilda do Carmo (melhor chefe do mundo), Carleane Pinheiro, Edilândia Alencar, Vânia Viana e Elaine Sousa (por todas as trocas e substituições);

Aos familiares que de alguma forma contribuíram com incentivo e torcida (isso também é importante e motivador);

Maria Vilani Rodrigues (Vila) por todo auxílio durante a execução dos experimentos;

A CAPES, FUNCAP e CNPQ por financiarem nossas pesquisas.

O senhor é o meu pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Salmos 23:1-6

RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) está entre as principais causas de incapacidade no mundo. Pesquisas a respeito da fisiopatologia deste transtorno mental que possibilitem a descoberta de novos alvos para seu tratamento têm sido amplamente realizadas. A hipótese das citocinas pró-inflamatórias, na depressão, resultantes, por exemplo, da resposta a estressores psicossociais, são fundamentais na mediação das características fisiopatológicas do TDM. Ademais, pacientes deprimidos apresentam aumento de LPS sanguíneo, como consequência de uma disbiose intestinal. Neste contexto, a administração da endotoxina bacteriana lipopolissacarídeo (LPS) ou de citocinas pró-inflamatórias podem causar sintomas depressivos em roedores e humanos. Neste contexto, buscou-se determinar no presente trabalho o efeito de antidepressivos nas alterações neuroimunes induzidas por LPS (protocolo 1), bem como o papel das isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no modelo inflamatório de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS (protocolo 2). Para tanto foram avaliados comportamentos relacionados ao TDM, como desespero comportamental, anedonia e motivação, 24 h após a administração da endotoxina, para o desenvolvimento de comportamentos tipo depressivo, além da avaliação da atividade da MPO e níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , IL-4 e IL-6 nas áreas cerebrais, córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e Hipotalamo (HT). Os resultados do protocolo 1 mostraram que a exposição ao LPS causou aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, além de aumentar as citocinas da resposta Th1, TNF- α e IFN- γ . Estas alterações foram prevenidas pela administração dos antidepressivos tranilcipromina (TCP), amitriptilina (AMI), escitalopram (ESC), e vortioxetina (VORT), com especial atenção para a VORT que apresentou os melhores resultados nos testes comportamentais e avaliações neuroimunes. No protocolo 2, observamos que os bloqueadores da NOS, L-NAME, 7-NI e 1400 W, respectivamente bloqueadores da NOS total, NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS), foram capazes de prevenir as alterações no teste de desespero comportamental, mas apenas o 7-NI foi eficaz na prevenção dos sintomas de anedonia, através do teste de preferência por Sacarose, bem como apresentar efeito ansiolítico através da exploração do centro do campo aberto. Os bloqueadores apresentaram efeitos distintos com relação às alterações neuroimunes cerebrais com destaque para o 7-NI e 1400 W. De forma geral este trabalho aponta para um efeito imunomodulador distinto entre antidepressivos de diferentes classes, com destaque para a vortioxetina, a qual apresentou melhores resultados juntamente com a tranilcipromina, bem como para um papel central da nNOS na mediação de comportamentos depressivos e alterações neuroinflamatórias induzidas pelo LPS.

Palavras-chaves: Lipopolissacarídeo, Depressão, Óxido Nítrico Sintase, Citocinas, Inflamação.

ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is among the leading causes of disability in the world. Research on the pathophysiology of this mental disorder that enables the discovery of new targets for its treatment has been widely conducted. The hypothesis of proinflammatory cytokines in depression, resulting, for example, from the response to psychosocial stressors, is fundamental in mediating the pathophysiological characteristics of MDD. In addition, depressed patients have increased blood LPS as a consequence of intestinal dysbiosis. In this context, administration of bacterial lipopolysaccharide endotoxin (LPS) or proinflammatory cytokines may cause depressive symptoms in rodents and humans. In this context, the aim of this study was to determine the effect of antidepressants on LPS-induced neuroimmune changes (protocol 1), as well as the role of nitric oxide synthase (NOS) isoforms in the inflammatory model of depression induced by systemic administration of LPS (protocol 2). For this purpose, behaviors related to MDD, such as behavioral despair, anhedonia and motivation, 24 hours after endotoxin administration were evaluated for the development of depressive behaviors, besides the evaluation of MPO activity and levels of TNF- α , IFN- γ and IL-1 β , IL-4 and IL-6 in the brain, prefrontal cortex (CPF), hippocampus (HC), striatum (CE) and hypothalamus (HT) areas. The results from protocol 1 showed that exposure to LPS caused an increase in proinflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6, as well as increasing Th1, TNF- α and IFN- γ response cytokines. These changes were prevented by the administration of tranylcypromin (TCP), amitriptyline (AMI), escitalopram (ESC), and vortioxetine (VORT) antidepressants, with particular attention to VORT which showed the best results in behavioral testing and neuroimmune assessments. In protocol 2, we observed that the NOS blockers, L-NAME, 7-NI and 1400 W, respectively total NOS blockers, neuronal NOS (nNOS) and inducible NOS (iNOS), were able to prevent changes in the despair test. behavioral, but only 7-NI was effective in preventing anhedonia symptoms through the sucrose preference test, as well as showing anxiolytic effect by exploring the open field center. Blockers showed distinct effects in relation to brain neuroimmune alterations, especially 7-NI and 1400 W. In general, this work points to a distinct immunomodulatory effect between antidepressants of different classes, especially vortioxetine, which showed better results. together with tranylcypromin as well as for a central role of nNOS in mediating depressive behaviors and LPS-induced neuroinflammatory changes.

Keywords: Lipopolysaccharide, Depression, Nitric Oxide Synthase, Cytokines, Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos potenciais de efeitos de citocinas inflamatórias sobre os sistemas de neurotransmissores de monoamina, glutamato e BDNF no cérebro.....	21
Figura 2.	Ativação e sinalização de TLR4 a partir da membrana celular e dos endossomos.	30
Figura 3.	Hipótese da Neuroinflamação.....	32
Figura 4.	Reação global catalisada e cofatores de NOS.....	35
Figura 5.	Via glutamatérgica/NO no sistema nervoso central.....	37
Figura 6.	Síntese das vias do óxido nítrico e da L -arginina-óxido nítrico-cGMP..	38
Figura 8.	Desenho Experimental – Protocolo 1.....	47
Figura 9.	Teste do Nado Forçado.....	48
Figura 10.	Movimentos de grooming.....	49
Figura 11.	Desenho Experimental – Protocolo 2.....	53
Figura 12.	Tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS	56
Figura 13.	Teste de Borrifagem de sacarose ("SPLASH TEST") em ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	57
Figura 14.	Teste de Campo Aberto com ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	58
Figura 15.	Níveis de IL1- β no sangue periférico de ratos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.	59
Figura 16.	Níveis de Corticosterona no sangue periférico de ratos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.	60
Figura 17.	Níveis de Nitrito em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	61

Figura 18.	Níveis de IL-1 β em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	62
Figura 19.	Níveis de INF γ em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	64
Figura 20.	Níveis de TNF- α em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	66
Figura 21.	Níveis de IL-4 em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	68
Figura 22.	Níveis de IL-6 em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com antidepressivos por dez dias e administração única de LPS.....	69
Figura 23.	Tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS.....	70
Figura 24.	Teste da Preferência por Sacarose em ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS.....	71
Figura 25.	Teste do Campo Aberto em ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS.....	73
Figura 26.	Avaliação da Atividade da MPO em áreas cerebrais de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS.....	74
Figura 27.	Avaliação das concentrações de INF γ em áreas cerebrais de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS.....	75
Figura 28.	Avaliação das concentrações de TNF- α em áreas cerebrais de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS.....	76

- Figura 29. Avaliação das concentrações de IL-4 em áreas cerebrais de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS..... 77
- Figura 30. Avaliação das concentrações de IL-6 em áreas cerebrais de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, tratados com administração única de LPS e com bloqueadores da NOS..... 79

LISTA DE QUADROS

Quadro 01.	Sistemas de neurotransmissores e mecanismos de transdução de sinal envolvidos na fisiopatologia da depressão.....	25
Quadro 02.	Modelos de Depressão.....	27
Quadro 03.	Efeitos do tipo antidepressivo de vários inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) e da variedade de experimentos comportamentais em animais.....	39
Quadro 04.	Representação esquemática dos efeitos de TCP, AMI, EXC e VORT, sobre os testes comportamentais.....	80
Quadro 05.	Representação esquemática dos efeitos de TCP, AMI, EXC e VORT, sobre os testes Neuroquímicos	81
Quadro 06.	Representação esquemática dos efeitos de LPS, L-NAME, 7-NI e 1400W sobre os testes comportamentais	83
Quadro 07.	Representação esquemática dos efeitos de LPS, L-NAME, 7-NI e 1400W sobre os testes neuroquímicos.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina

5-HTT / DAT – Transportadores de Serotonina e Dopamina

μ l – microlitro

μ M – micromolar

$^{\circ}$ C – grau Celsius

AC – adenilil ciclase

AMI – Amitriptilina

BH4 – tetrahidrobiopterina

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CaM – Calmodulina Central

COX-2 – Ciclooxygenase-2

CAT – Catalase

CE – corpo estriado

cm – centímetro

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

PF – córtex pré-frontal

CMS – Modelos de estresse leve crônico (CMS)

CREB – Proteína Ligante ao Elemento Responsivo ao AMPc

EDRF - Fator de Relaxamento Dependente do Endotélio

EDTA – ácido tetra acético etilenodiamina

ELS – Modelo de Estresse no início da vida

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

ERO – espécie reativa de oxigênio

ESC – Escitalopram

FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo

FMN - Emonucleótido de Flavina-adenina

g – grama

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GC – Guanilil Ciclase

GMPc – Monofosfato Cíclico de Guanosina

GSH – Glutathiona

GSK3 – glicogênio sintase quinase 3
GTP – Trifosfato de guanosina
h – hora
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HP – hipocampo
HPA – eixo hipotálamo-pituitária
HT – Hipotálamo
IL – Interleucina
IDO – Indoleamino-2,3-di-oxigenase
IFN- γ – Interferon- γ
iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível
i.p. – intraperitoneal
i.c.v – Intra Cérebro Ventricular
Kg – quilograma
LPS – Lipopolissacarídeo
MAO – monoamina oxidase
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno
MAPKs – proteínas quinases ativadas por mitógenos p38
MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos-1
MDD - Distúrbio Depressivo Maior
mg – miligrama
min – minuto
ml – mililitro
mM – milimolar
MyD88 – proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88 ()
NADPH – fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
ng – nanograma
nm – nanômetro
nM – nanomolar
nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO – Óxido Nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PGE₂ – prostaglandina E₂
pH – potencial hidrogeniônico

PKC – proteína quinase C
PLC – fosfolipase C
RNS – Espécies Reativas de nitrogênio
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
rpm – rotação por minuto
SERT – Transmissor de serotonina
sGC – guanilato ciclase solúvel
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
TBARS – Ácido Tiobarbitúrico
TCP – Trancilpromina
TDM – Transtorno Depressivo Maior
TIR – domínio citoplasmáticos tipo Toll/1L-1R
TLR – Toll-like
TRAM – molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF – Adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon- β
Trk B – tirosina quinase B
VMAT2 – Transportador de monoamina vesicular
VORT – Vortioxetina
W – watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Hipóteses e Fisiopatologia da Depressão.....	22
2.2 Modelos animais de depressão.....	26
2.3 Lipopolisacarídeo (LPS)	29
2.4 Neuroinflamação.....	31
2.5 Citocinas e Depressão	33
2.6 Óxido Nítrico (NO).....	34
2.7 Depressão e NO.....	36
2.8. Tratamento para Depressão.....	40
2.8.1 Tracilpromina.....	40
2.8.2 Amitripitilina.....	40
2.8.3 Excitalopram.....	41
2.8.4 Vortioxetina	41
3 PERGUNTAS DE PARTIDA.....	43
4 HIPÓTESES.....	43
5 OBJETIVOS	44
5.1 Geral.....	44
5.2 Específicos.....	44
5.2.1 Específicos do protocolo 1.....	44
5.2.2 Específicos do protocolo 2.....	44
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
6.1 Animais	46
6.2 Protocolo 1.....	46
6.2.1 Drogas.....	46
6.2.2 Desenho experimental.....	47
6.2.3 Testes comportamentais.....	48
6.2.3.1 Teste de Nado Forçado.....	48
6.2.3.2 Teste do Campo Aberto.....	49
6.2.3.3 Teste de Borrifagem de Sacarose ("SPLASH TEST")	49
6.2.4 Dosagem de Corticosterona e IL-1 β no sangue dos animais.....	49
6.2.4.1 Dosagem de Corticosterona.....	50
6.2.4.2 Dosagem de IL-1 β	50
6.2.5 Testes Neuroquímicos.....	50
6.2.5.1 Determinação do conteúdo de nitrito	51

6.2.5.2 Teste de ELISA para dosagem dos níveis de INF γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-6.....	51
6.3 Protocolo 2.....	52
6.3.1 Drogas.....	52
6.3.2 Cirurgia Estereotáxica.....	52
6.2.3 Desenho experimental.....	53
6.3.4 Testes comportamentais.....	53
6.3.4.1 Teste de Nado Forçado.....	53
6.2.4.2 Teste do Campo Aberto.....	54
6.3.4.3 Teste de preferência pela sacarose (PPS).....	54
6.3.5 Testes Neuroquímicos.....	54
6.3.5.1 Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	54
6.3.5.2 Teste de ELISA para dosagem dos níveis de INF γ , TNF- α , IL-4 e IL-6	55
6.4 Análise estatística dos resultados.....	55
7 RESULTADOS	56
7.1 Avaliação da ação das drogas antidepressivas no nado forçado em ratos expostos ao LPS.....	56
7.2 Avaliação da ação das drogas antidepressivas no Teste de Borrifagem de sacarose (“SPLASH TEST”) em ratos expostos ao LPS.	57
7.3 Avaliação da ação das drogas antidepressivas no campo aberto em ratos expostos ao LPS.....	57
7.4 Avaliação dos níveis de IL-1 β no sangue periférico de animais tratados com drogas antidepressivas e expostos ao LPS.	58
7.5 Avaliação dos níveis de Corticosterona no sangue periférico de animais tratados com drogas antidepressivas e expostos ao LPS.....	59
7.6 Mediadores da Resposta Imune Inata	60
7.6.1 Avaliação da ação das drogas antidepressivas sobre as concentrações de Nitrito em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.	60
7.6.2 Avaliação da ação das drogas sobre as concentrações de IL-1 β em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	62
7.7 Mediadores da Resposta Th1.....	63
7.7.1 Avaliação da ação das drogas sobre as concentrações de INF γ em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	63
7.7.2 Avaliação da ação das drogas sobre as concentrações de TNF- α em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	65
7.8 Mediadores da Resposta Th2.....	67

7.8.1 Avaliação da ação das drogas sobre as concentrações de IL-4 em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.	67
7.8.2 Avaliação da ação das drogas sobre as concentrações de IL-6 em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	69
7.9 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS no nado forçado em ratos expostos ao LPS.....	70
7.10 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre a preferência por sacarose em ratos expostos ao LPS.....	71
7.11 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS no campo aberto em ratos expostos ao LPS.....	72
7.12 Mediadores da Resposta Imune Inata	74
7.12.1 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre a atividade da mieloperoxidase em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	74
7.13 Mediadores da Resposta Th1.....	75
7.13.1 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre as concentrações de INF γ em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	75
7.13.2 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS as concentrações de TNF- α em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	76
7.14 Mediadores da Resposta Th2.....	77
7.14.1 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre as concentrações de IL-4 em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	77
7.14.2 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre as concentrações de IL-6 em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.....	78
7.15 Resumo dos resultados.....	80
8 DISCUSSÃO.....	85
8.1 Efeito imunomodulador de diferentes classes de antidepressivos.....	85
8.1 Papel da NOS no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS.....	89
9 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
APÊNDICE – Paper Submetido a Revista Científica Qualis A1.....	119

1 INTRODUÇÃO

A transtorno depressivo maior (TDM) ou simplesmente depressão é um transtorno mental crônico amplamente conhecido tanto para o público em geral quanto para a comunidade médica, mas sua gravidade e complexidade não são suficientemente compreendidas e reconhecidas, com prevalência estimada ao longo da vida de 14,6% em países desenvolvidos e de 11,1% em países em desenvolvimento, sendo uma das principais fontes de incapacidade em todo o mundo (ZHANG et al., 2016). O TDM afeta mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, com uma em cada 20 pessoas relatando um episódio depressivo dentro de um ano, sendo atualmente a principal causa de incapacidade em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Entretanto o TDM é uma doença grave e debilitante caracterizada por uma ampla variedade de sintomas, incluindo pelo menos um dos dois principais critérios referentes a humor deprimido e perda de interesse, motivação ou prazer, acompanhados por pelo menos quatro dos sintomas adicionais relacionados ao eixo físico (apetite, sono, dor, falta de energia), sintomas psicomotores e sintomas relacionados a funções cognitivas (incapacidade de planejar ou decidir, pensamento lento, déficits de memória e atenção) ou o conteúdo do pensamento (morte ou morrer, suicídio, culpa) (GONG et al., 2018).

Atualmente, o diagnóstico do TDM baseia-se principalmente no exame clínico e na avaliação subjetiva dos sintomas depressivos, não há um biomarcador aprovado como parte dos critérios diagnósticos para qualquer transtorno psiquiátrico (BANDELOW et al., 2017), fato que dificulta o diagnóstico e pode induzir a imprecisão do mesmo.

Nas últimas décadas um grande esforço e empenho tem sido empregado para formulação e implementação de testes não invasivos e quantitativos, que tivessem eficácia no diagnóstico do TDM, no entanto, a Medicina Psiquiátrica ainda não dispõe desse recurso (LAKHAN; VIEIRA; HAMLAT, 2010). O fato de haver muitos problemas relacionados à investigação dos mecanismos biológicos subjacentes ao TDM são obstáculos para descoberta de um recurso diagnóstico eficaz, dentre esses problemas, podemos citar a falta de um modelo animal adequado de depressão, a presença de diferentes subtipos e a mudança contínua deste subgrupo, a alta incidência de comorbidades físicas e psiquiátricas relacionadas ao TDM a inclusão de um conjunto de distúrbios biologicamente e clinicamente heterogêneos e a falta de especificidade e sensibilidade de um único biomarcador (HACIMUSALAR; EŞEL, 2018).

A fisiopatologia da depressão permanece incompletamente compreendida e pode envolver a complexa interação de fatores genéticos e ambientais (VIALOU et al., 2013). A

herdabilidade da depressão foi estimada em 37% de acordo com estudos realizados com crianças de gêmeas (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000).

O TDM é um transtorno crônico, recorrente que ameaça a qualidade de vida do indivíduo e da família (DUMAN, 2010). Apesar dos avanços no conhecimento da neurobiologia da depressão e mecanismo de ação dos antidepressivos, a terapia farmacológica atual, ainda se baseia na antiga hipótese das monoamina (RACAGNI; POPOLI, 2010; SCHILDKRAUT, 1965). Embora estas drogas proporcionem uma melhora nas condições clínicas dos pacientes, o seu início de ação é lento e apresentam muitos efeitos adversos. Além disso, apenas 30% dos pacientes com depressão respondem ao tratamento antidepressivo inicial (BERLIM; TURECKI, 2007; NESTLER; GOULD; MANJI, 2002).

Neste contexto, novas hipóteses além das monoaminas têm sido investigadas na tentativa de elucidar os mecanismos fisiopatológicos da depressão. Evidências derivadas de estudos anatômicos, neuroquímicos, farmacológicos e comportamentais que demonstram importante associação entre a diferença de gênero e a predisposição, bem como no prognóstico da depressão (KULESZA; RAGURAM; RAO, 2014).

Considerando ainda a complexidade e heterogeneidade dos transtornos depressivos (KRISHNAN; NESTLER, 2008) e as relações fisiopatológicas e mecanismo de ação das drogas amplamente utilizadas na prática clínica, aliados às crescentes evidências da participação do estresse oxidativo e de processos inflamatórios na patogênese da depressão (MAES, 2011a), decidiu-se investigar os efeitos neuroimunes do antidepressivo multimodal vortioxetina, bem como de antidepressivos de outras classes, como amitriptilina (tricíclico), escitalopram (inibidor seletivo da recaptação de serotonina), tranilcipromina (inibidor da MAO) em modelo inflamatório de depressão induzido por LPS. Ademais, investigou-se o papel das isoformas de óxido nítrico sintase (NOS) na depressão induzida por LPS como forma de contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no componente inflamatório da depressão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiopatologia da Depressão

Apesar da compreensão da fisiopatologia do TDM, ter progredido consideravelmente, nenhum modelo ou mecanismo isolado pode explicar claramente todos os aspectos da doença. Diversas causas ou fisiopatologias podem estar por trás de episódios em diferentes pacientes, ou até mesmo episódios distintos no mesmo paciente em momentos diferentes. Estressores psicossociais e estressores biológicos podem resultar em diferentes patogêneses e responder a diferentes intervenções (MALHI; MANN, 2018).

A hipótese de depressão das monoaminas, é uma teoria fisiopatológica do TDM formulada há quase cinquenta anos. Esta hipótese propõe que pacientes com depressão tenham esgotado ou reduzido as concentrações de serotonina, norepinefrina e dopamina. As evidências primárias que levaram ao desenvolvimento da hipótese das monoaminas, foram: os efeitos da reserpina sobre a serotonina e as catecolaminas e os mecanismos farmacológicos da ação dos antidepressivos (DELGADO, 2000; HIRSCHFELD, 2000).

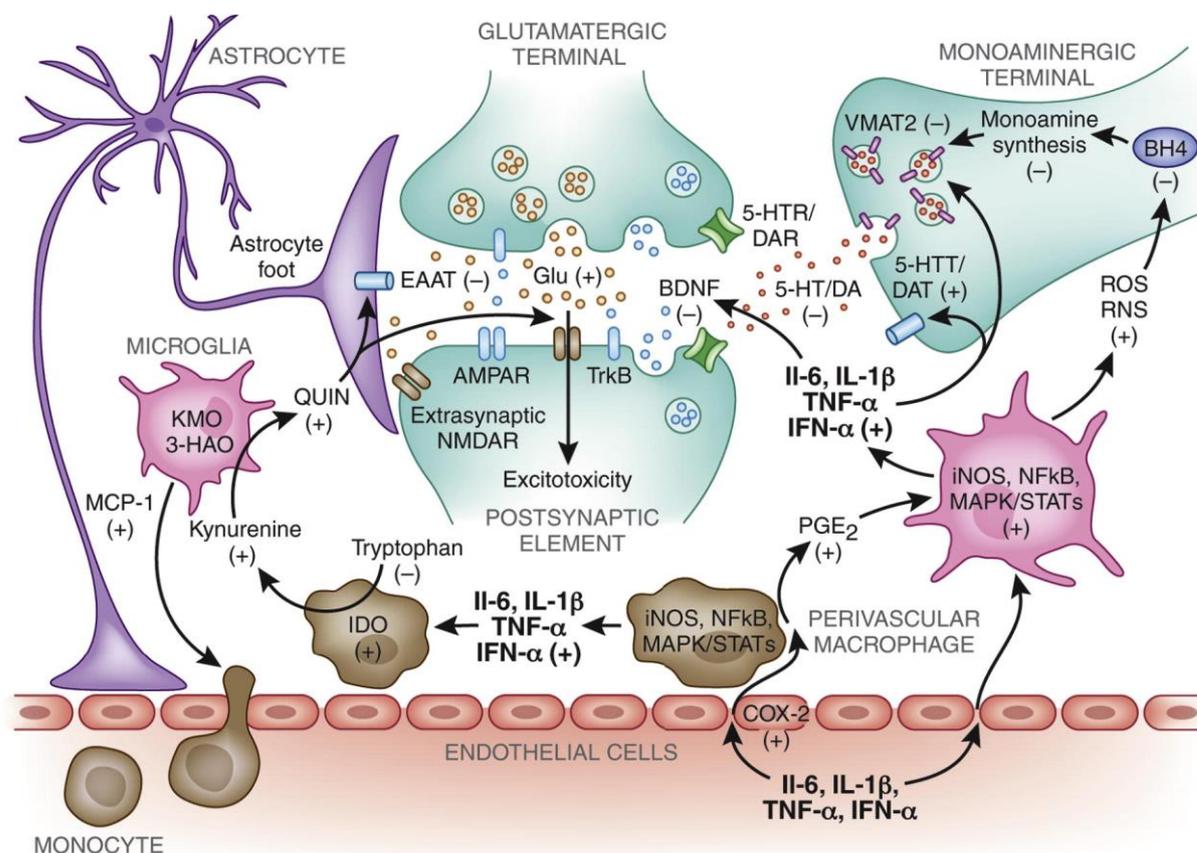
Várias linhas de pesquisa apontam para o papel do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) na fisiopatologia da depressão. A hipótese da neurotrofina na depressão, aponta o BDNF como principal mediador do TDM e ressalta que as anormalidades na plasticidade cerebral nas regiões que regulam a emoção e a memória, incluindo o hipocampo, precedem a doença (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997). Evidências pré-clínicas sugerem que os efeitos terapêuticos dos antidepressivos resultam na regulação positiva da expressão do BDNF no hipocampo (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997). Estudos clínicos indicam que os níveis periféricos de BDNF são mais baixos em pacientes com TDM em comparação com Controles saudáveis (MOLENDIJK et al., 2014).

As citocinas membros da família das interleucinas (IL), são produzidas por macrófagos, células natural killer e linfócitos T. Podem ser classificadas em pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. A IL-1, a IL-6 e o fator de necrose tumoral α (TNF α) são conhecidos como citocinas pró-inflamatórias e IL-4, IL-10 e IL-13 são conhecidas como citocinas anti-inflamatórias (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). As citocinas são importantes no desenvolvimento e manutenção da função cerebral normal, apoiando remodelação sináptica, integridade neuronal e a neogênese, além de criam respostas comportamentais influenciando os sistemas de neurotransmissores (HAROON; RAISON; MILLER, 2012; YIRMIYA; GOSHEN, 2011).

Pacientes com citocinas inflamatórias elevadas em decorrências de diversas doenças inflamatórias/infecciosas apresentam índices epidemiológicos de depressão superiores a população em geral (YIRMIYA et al., 2000), estudos realizados corroboram essa afirmação, alguns pacientes com TDM sem co-morbididades apresentam citocinas circulantes e marcadores inflamatórios aumentados (DOWLATI et al., 2010; MAES, 1999). Vale ressaltar que em estudos pré-clínico e clínicos, a administração de citocinas a humanos e animais, produziu alterações comportamentais e sintomas neuropsiquiátricos e consistentes com depressão (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009).

De acordo com a figura 1, citocinas periféricas podem chegar ao sistema nervoso central e através das células endoteliais, macrófagos perivasculares e micróglia, elevar a produção de mediadores inflamatórios locais, como o óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), ciclooxigenase-2 (COX-2), citocinas e quimiocinas. Células imunes periféricas são recrutadas através da produção de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) que produzem ainda mais citocinas e mediadores inflamatórios. Essas citocinas estão associadas ao aumento do estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN), sendo que a elevação deste último fator contribui para a oxidação da tetrahidrobiopterina (BH4), um co-fator necessário para a síntese de monoaminas. Há evidências indicando que citocinas inflamatórias e suas vias de transdução de sinal, tais como proteínas quinases ativadas por mitógenos p38 (MAPKs), podem reduzir a expressão ou função do transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2) e / ou aumentar a expressão ou função de transportadores de serotonina e dopamina (5-HTT / DAT). As citocinas também podem interferir na sinalização do receptor TrkB e diminuir o BDNF, podendo influenciar negativamente a neurogênese e a neuroplasticidade. Além disso, as citocinas inflamatórias podem afetar o sistema glutamato (Glu) pela ativação da enzima indoleamino-2,3-dioxigenase (IDO), que cataboliza o triptofano, o precursor primário do aminoácido 5-HT, na quinurenina (FELGER; LOTRICH, 2013).

Figura 1: Mecanismos potenciais de efeitos de citocinas inflamatórias sobre os sistemas de neurotransmissores de monoamina, glutamato e BDNF no cérebro



Fonte: (FELGER; LOTRICH, 2013).

Herança genética da depressão vem sendo estudada como hipótese para gênese da doença, um estudo com gêmeos evidenciou que a herdabilidade da depressão foi estimada em um percentual superior a 35% (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000). A heterogeneidade fenotípica tem dificultado a busca das variantes relacionadas ao risco genético para a depressão, esse fator pode implicar diretamente em arquiteturas genéticas distintas (MULLINS; LEWIS, 2017). Trabalhos recentes com grande amostragem evidenciaram a identificação das primeiras variantes genéticas de risco para contrair depressão (CONVERGE CONSORTIUM, 2015; HYDE et al., 2016; MULLINS; LEWIS, 2017).

Portanto, outras vias de sinalização e neurotransmissores podem estar relacionadas com a fisiopatologia da depressão, descritos no quadro 1:

Quadro 1: Sistemas de neurotransmissores e mecanismos de transdução de sinal envolvidos na fisiopatologia da depressão.

Alteração:	Autor:
<ul style="list-style-type: none"> Via da L-arginina / óxido nítrico (NO) 	(JOCA; GUIMARÃES, 2006; KUMAR et al., 2010)
<ul style="list-style-type: none"> Sistema glutamatérgico 	(HASHIMOTO; SAWA; IYO, 2007; KRYSTAL et al., 2002; LAPIDUS; SOLEIMANI; MURROUGH, 2013; PETRIE; REID; STEWART, 2000)
<ul style="list-style-type: none"> Sistema opióide 	(GABILONDO; JAVIER MEANA; GARCÍA-SEVILLA, 1995; GAVÉRIAUX-RUFF; KIEFFER, 2002; KEASLING et al., 2019)
<ul style="list-style-type: none"> Sistema GABAérgico 	(LÜSCHER; MÖHLER, 2019; PETTY; SHERMAN, 1981)
<ul style="list-style-type: none"> Proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK)/cinase regulada por sinal extracelular (ERK). 	(YANIV et al., 2010; ZHU et al., 2010)
<ul style="list-style-type: none"> Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB). 	(BLENDY, 2006; PERLIS et al., 2007; ZUBENKO et al., 2002)
<ul style="list-style-type: none"> Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). 	(KAREGE et al., 2002; SOUSA et al., 2015)
<ul style="list-style-type: none"> Proteína cinase C (PKC); Proteína cinase A (PKA); Glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3). 	(PICCHINI; MANJI; GOULD, 2004)
<ul style="list-style-type: none"> Proteína antiapoptótica Bcl2. 	(SHISHKINA et al., 2010; ZHANG et al., 2014)
<ul style="list-style-type: none"> Liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas com a ativação do sistema imune. 	(RITTBERG, 2016; YIRMIYA et al., 2000)
<ul style="list-style-type: none"> Aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides; 	(HOLSBOER, 2000; JOËLS et al., 2008; JURUENA et al., 2010)
<ul style="list-style-type: none"> Desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). 	(LEMBKE et al., 2013)
<ul style="list-style-type: none"> Aumento no estresse oxidativo. 	(MAES, 2008; SARANDOL et al., 2007)

Fonte: TOMAZ, 2014 - Adaptado

Os primeiros estudos com hipóteses relacionando o TDM a desregulações no processo inflamatório ocorreram na década de 80 (DANTZER, 2008). Desde então, modelos animais que induzem um comportamento tipo-depressivo, são induzidos com um estímulo inflamatório periférico na fase aguda, embora esses mecanismos ainda não estejam totalmente esclarecidos (DANTZER et al., 2008; RICHTER et al., 2011).

2.2 Modelos animais de depressão

Três características básicas são estabelecidas para construção de um bom modelo animal, são estas: validade preditiva (sensibilidade a farmacológica e não farmacológica, além de intervenções que são eficazes para a doença ou condição em humanos também seja eficaz no modelo), validade aparente (fenótipo semelhante ao humano que tem a doença) e validade de construto (a fisiopatologia da doença humana são recapitulados com o modelo) (NESTLER; HYMAN, 2010). Além destas, estudos propõem a inclusão de outras características, como a validade mecanística (mecanismos cognitivos ou biológicos semelhantes), validade patogênica (validade etiológica e biomarcadores) e validade homológica (validade de espécies e estirpes) (BELZUNG; LEMOINE, 2011).

Com base na etiologia da depressão, os modelos animais foram desenvolvidos com base na exposição aguda ou crônica ao estresse (MCGONAGLE; KESSLER, 1990), interação gene-ambiente (UHER; MCGUFFIN, 2010), administração exógena de glicocorticóides (SURÍS et al., 2010) e manipulações genéticas (CASPI; MOFFITT, 2006).

Aplicar fatores estressores com intuito provocar sintomas fenotípicos da depressão é bem aceito como modelos pré-clínicos de estudo da referida doença. Modelos de estresse leve crônico (CMS), mimetizando a experiência diária de estresse em humanos, são modelos pré-clínico de depressão altamente validado, e desencadeiam a anedonia, que é uma manifestação central, frequentemente presente na doença (MARTIS et al., 2018). Além disso, os ratos expostos à CMS exibem alterações no sono e peso corporal, diminuição da atividade sexual e comportamento agressivo, que são sintomas clássicos da depressão (WIBORG, 2013).

Quadro 02: Modelos de Depressão

Autor	Descrição do Protocolo
Modelo crônico de estresse leve imprevisível (NOLLET; LE GUIQUET; BELZUNG, 2013)	Camundongos BALB, com aproximadamente 8 semanas vida são colocados em gaiolas com um ambiente estável (invertido de 12 h ciclo claro/escuro, temperatura 22 ± 1 ° C, humidade de $55 \pm 10\%$) por nove semanas. Os testes comportamentais foram realizados na oitava semana, os mesmos evidenciaram que animais submetidos ao stress moderado apresentavam sintomas de depressão.
Modelo de Estresse no início da vida (BATH; MANZANO-NIEVES; GOODWILL, 2016)	Camundongos C57BL, quatro dias após o nascimento são transferidos juntos com a mãe de sua gaiola padrão para uma gaiola com um fundo de tela de arame com um acolchoado de algodão, medindo 2X4 cm, como sua única cama, para alojar mãe e filhotes, o grupo permanece por uma semana, nessa condição. Fato que leva a um número significativo de partidas (Ausência do ninho), levando ao cuidado maternal fragmentado por parte da mãe e resultado em comportamento característico de depressão no decorrer do desenvolvimento dos animais expostos.
Desamparo Aprendido (SELIGMAN, 1975)	150 Cães foram colocados em câmaras das quais não podiam escapar, foram aplicados choques elétricos nas patas. Eles foram então testados em uma câmara onde eles tinham uma rota de fuga visível; eles precisavam pular um obstáculo quando o choque fosse aplicado para escapar de choques futuros. Ao final do teste, 100 cães sujeitos ao choque inescapável não tentaram escapar do choque quando colocados na caixa de transporte de fuga. Se um cão indefeso aprendido fosse colocado em uma câmara sem barreira e recebesse choque, simplesmente ele deitava e aguardava o término do choque. Se um manipulador arrastasse repetidamente o cão pela coleira para o lado da caixa onde o choque elétrico não estava sendo aplicado, o cão acabaria aprendendo a escapar sozinho do choque. O pesquisador concluiu este era um robusto modelo de depressão, uma vez que criou um cenário impossível, inescapável e incontrolável, uma resultante <u>reação depressiva</u> e um método para melhorar o comportamento aprendido.

Quadro 02: Modelos de Depressão (continuação)	
Modelo de bulbectomia olfativa (OBX) (KELLY; WRYNN; LEONARD, 1997)	Realizou-se a remoção do bulbo olfatório de ratos Sprague-Dawley machos. Duas semanas após o procedimento, observou-se as seguintes alterações comportamentais: hiperatividade em uma arena fechada, como o campo aberto; hiperatividade noturna aumentada em um monitor de atividade em casa de 24 horas; déficits na memória, como mostrado pelo comportamento de esquiva passiva e no labirinto de Morris e no labirinto radial de 8 braços; aumento de entradas no braço aberto no labirinto em cruz elevado; e mudanças nos alimentos motivaram e condicionaram o comportamento de aversão ao sabor. Além de alterações neuroquímicas. Todas as alterações foram revertidas com administração de antidepressivos tricíclicos.
Indução por Administração repetida de Corticosterona (HILL et al., 2003)	Ratos machos Long-Evans (Charles River, Canadá) administração de 20 mg / kg de Corticosterona por dia, durante 20 dias. No vigésimo primeiro, o teste de nado forçado, evidenciou aumento no tempo de imobilidade do grupo tratado com corticosterona.
Depressão Crônica (KUBERA et al., 2013)	Foi proposto um novo modelo animal de, a partir do desafio com LPS via intraperitoneal (i.p) por 5 dias ao mês, sendo as doses aumentadas todos os dias durante os primeiros três dias e foi gradualmente diminuída nos dias 4 e 5, ie dia 1: 750 µg / kg, dia 2: 1000 µg / kg, dia 3: 1250 µg / kg, dia 4 : 1000 µg / kg e dia 5: 750 µg / kg, posteriormente, um período de um mês de descanso até a repetição do protocolo, que se repetiu por mais três meses. Ao final, observou-se um quadro de neuroinflamação crônica, alterações comportamentais e neuroquímicas condizentes com endofenótipos depressivos, como anedonia e redução de BDNF, e com validade preditiva testada pela administração de um inibidor seletivo de recaptção de serotonina (fluoxetina) capaz de reverter os endofenótipos depressivos.
Depressão-Símile (Depressive-like) (CUSTÓDIO et al., 2013; FERREIRA MELLO et al., 2013; OHGI et al., 2013)	Foi administrado 0,5mg de LPS via i.p de Ratos BALB machos, após 24hs da administração, observou-se sintomas tipo-depressão (depressive-like), dentre estes sintomas, destacou-se o aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado e alterações neurobiológicas, como o aumento de citocinas em tecidos cerebrais, removidos <i>post mortem</i> dos animais.

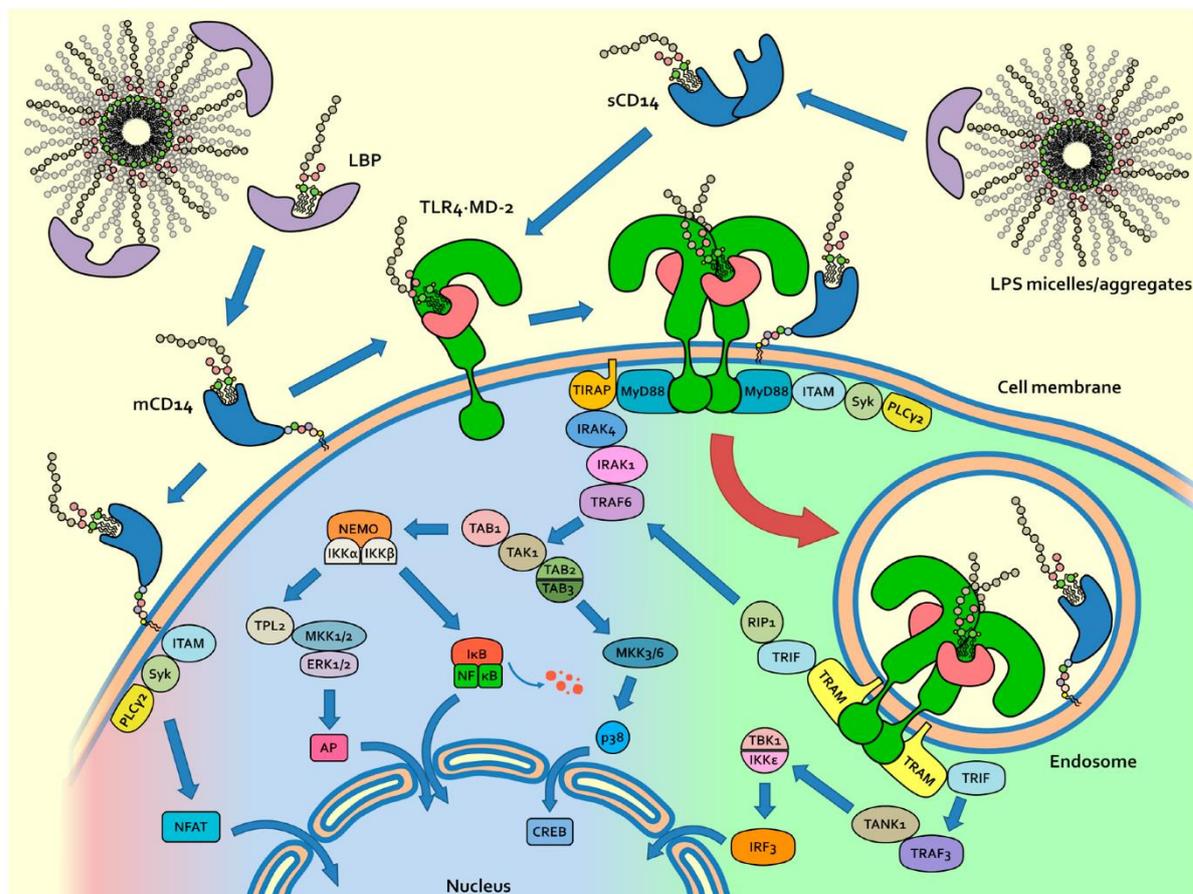
Fonte: A própria autora.

2.3 Lipopolissacarídeo (LPS)

O envelope celular de bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, contém duas membranas distintas, uma membrana interna e uma externa separadas por um compartimento hidrofílico com uma camada de peptidoglicano, chamado de periplasma. A membrana externa é uma bicamada assimétrica com fosfolipídios formando o folheto interno e o lipopolissacarídeo (LPS) formando o folheto externo, sendo este composto essencial para a viabilidade bacteriana. Além das fortes interações químicas laterais, o LPS tem como uma das funções, a de barreira de permeabilidade essencial. Bactérias, como *E. coli* e *Salmonella*, contêm aproximadamente $2-3 \times 10^6$ moléculas de LPS que cobrem mais de 75% de sua membrana externa (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Além de glicolípido complexo e altamente heterogêneo na composição, sua biossíntese, translocação e modificações do LPS requerem a função de mais de 100 genes, vários deles são essenciais e exclusivos para as bactérias, configurando-se como excelentes alvos de identificação de seus inibidores para o desenvolvimento de novos antibióticos (KLEIN; RAINA, 2019).

Apesar de atuar em vários receptores, o LPS, tem como principal alvo é o receptor Toll-like (TLR) (ALPIZAR et al., 2017; BOONEN et al., 2018). Após a ativação de TLR4 por LPS, ocorre o recrutamento adaptadores a jusantes cruciais para a sinalização do receptor, adaptador contendo domínio TIR (domínio citoplasmáticos tipo Toll/1L-1R) induzindo Interferon- β (TRIF), a proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e a molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) (RUCKDESCHEL et al., 2004) (Figura 2). O recrutamento desses adaptadores pode ativar ainda mais as vias a jusantes, culminando na ativação de fatores de transcrição, que por sua vez, induzem uma infinidade de genes pró-inflamatórios (GRAY et al., 2011).

Figura 2: Ativação e sinalização de TLR4 a partir da membrana celular e dos endossomos.



Fonte: (COCHET; PERI, 2017).

Em estudos anteriores realizados no nosso laboratório, demonstramos que a administração do LPS de forma crônica ou aguda, resulta em um aumento da duração da imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão de cauda, além de outros sintomas referidos como resposta à doença, além de alterações nos níveis de glutathiona (GSH), ácido tiobarbitúrico (TBARS), Nitrito e BDNF, dentre outras (CORDEIRO et al., 2019; CUSTÓDIO et al., 2013; FERREIRA MELLO et al., 2013; LOPES et al., 2018; MELLO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018; TOMAZ et al., 2014). Dessa forma, concluímos que a imobilidade aumentada nos testes de nado forçado e suspensão de cauda refletem um déficit no estado motivacional ou um fenótipo comportamental do tipo depressivo, pois a redução na duração da imobilidade durante esses dois testes é amplamente usada para identificar a eficácia de tratamentos antidepressivos, consequentemente, a resposta comportamental inversa seria reflexiva de um fenótipo depressivo (YAN et al., 2010).

2.4 Neuroinflamação

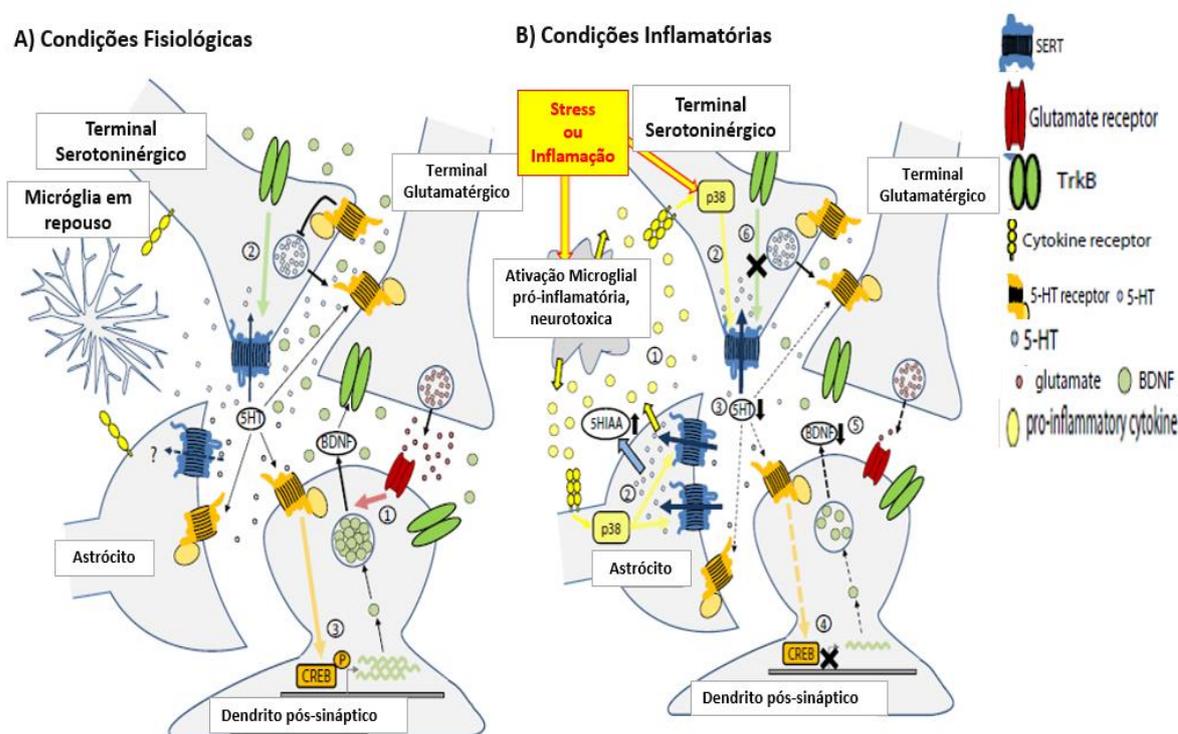
A neuroinflamação se caracteriza como um processo inflamatórios no Sistema Nervoso Central (SNC) (MAES, 2010). Esta por sua vez, pode ser caracterizada como resultado de um processo inflamatório sistêmico associada à gênese vários transtornos neuro-comportamentais (FAN et al., 2012). O aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, a elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, a ativação de células da glia e invasão de leucócitos são fatores que associam a neuroinflamação a alterações patológicas. (GLASS et al., 2010).

Apesar de considerarmos que o SNC, tem seu próprio sistema imunológico, independente do sistema imunológico periférico, acredita-se que os dois constantemente se comunicam e cooperem. Algumas evidências apontam para o envolvimento do SNC na regulação da imunidade e que respostas imunes na periferia levem a mudanças comportamentais

A maioria dos pacientes com TDM, desenvolve inicialmente sintomas de doença neurovegetativa e fadiga semelhantes à gripe. Posteriormente, uma parcela significativa desenvolve humor deprimido, anedonia, ansiedade, irritabilidade e distúrbios cognitivos (CAPURON; MILLER, 2004). Com o intuito de identificar mecanismos neurobiológicos que ligam a inflamação à depressão, vacinas e endotoxinas bacterianas (lipopolissacarídeo ou LPS) têm sido usadas para ativar experimentalmente o sistema imune inato, tanto em voluntários humanos saudáveis quanto em roedores (SALAZAR et al., 2012).

Está bem estabelecido que a inflamação sistêmica provoca a síntese de citocinas pró-inflamatórias, que se comunicam com o cérebro induzindo, mudanças comportamentais conhecidas como comportamento da doença, este comportamento inclui sinais semelhantes aos sintomas clínicos do TDM, tais como, perda de apetite, perturbação do sono, atividade reduzida e interesse social reduzido (DANTZER et al., 2008; PERRY, 2004).

Figura 3 : Hipótese da Neuroinflamação.



Fonte: (MAGDY et al., 2015) – Adaptado; 3A: 1- Em condições fisiológicas, BDNF é liberado de neurônios em uma forma dependente da atividade. 2- BDNF, através do seu receptor TrkB melhora a atividade SERT (Transmissor de serotonina). 3 - O aumento da atividade da SERT resulta em uma redução de 5-HT extracelular, diminuindo ativação da CREB dependente do receptor 5-HT e a expressão do gene BDNF; 3B: 1- A microgliais e os astrócitos tornam-se ativados e liberam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. 2- Citocinas e vias dependentes de stress aumentam a atividade SERT em neurónios, bem como a expressão do gene SERT aumento em astrócitos. Ambos os processos são mediados por p38 MAPK vias dependentes. 3 - O aumento da atividade da SERT resulta numa redução de níveis extracelulares de 5-HT, causando uma atenuação de sinalização através de receptores de 5-HT pré- e pós-sinápticos. 4- A expressão do gene dependente de CREB BDNF é reduzido. 5- Como uma consequência do nível de BDNF são diminuídos. 6- a regulação da atividade de SERT é desacoplado dos mecanismos dependentes do BDNF .

Uma das hipóteses da neuroinflamação, é que microgliais e os astrócitos tornam-se ativados e liberam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. Citocinas e vias dependentes de stress aumentam a atividade SERT em neurónios, bem como a expressão do gene SERT aumento em astrócitos. Ambos os processos são mediados por p38 MAPK dependentes. O aumento da atividade da SERT resulta numa redução de níveis extracelulares de 5-HT (Serotonina), causando uma atenuação de sinalização através de receptores de 5-HT pré- e pós-sinápticos. A expressão do gene dependente de CREB BDNF é reduzido. Como

consequência do nível de BDNF é diminuído e a regulação da atividade de SERT é desacoplado dos mecanismos dependentes do BDNF (MAGDY et al., 2015).

2.5 Citocinas e Depressão

A inflamação é uma resposta biológica protetora do organismo vivo como um todo, sendo este processo mediado por várias moléculas (NATHAN, 2002). A um grupo destas moléculas, atribuímos o nome de citocinas, elas são proteínas de baixo peso molecular e podem exercer um efeito pró ou anti-inflamatório (CAVAILLON, 2001).

Entre as citocinas, aquelas que promovem a cascata de inflamação são consideradas mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), quimiocinas e diversas classes de interferons. Quanto as citocinas anti-inflamatórias, podemos ressaltar o antagonista do receptor IL-1 (IL-1ra), IL-4, IL-10, IL11 e IL-13, que são produzidas para regular respostas de citocinas pró-inflamatórias (DINARELLO, 2000).

Sob condições fisiológicas as citocinas são geralmente mantidas em baixos níveis (PITOSI et al., 1997). Com relação a distúrbios psiquiátricos, as citocinas pró-inflamatórias desempenham papel crucial em sua fisiopatologia, tendo destaque a TDM (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009).

Os primeiros relatos que a inflamação causada por macrófagos pode ter um papel crucial na fisiopatologia da depressão datam do início dos anos 90 (SMITH, 1991). Em estudos posteriores, autores fizeram a associação em alterações pró-inflamatórias e depressão (KIM; MAES, 2003), a partir destas evidências constatou-se que citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, estão aumentadas no sangue periférico de pacientes com depressão (DOWLATI et al., 2010; KIM et al., 2007) e que citocinas como IL-2, IL-4, IL-10, e interferon- γ (IFN- γ), não foram significativamente alterados em pacientes portadores de TDM (DOWLATI et al., 2010). O fato de as citocinas pró-inflamatórias exógenas, incluindo o IFN- α , podem resultar em depressão (BONACCORSO et al., 2002) e que os níveis periféricos de marcadores inflamatórios estão associados à gravidade da depressão (SUAREZ et al., 2004), reforçam a relação direta das citocinas no TDM.

Especificamente em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, verificamos os seguintes achados: elevação do níveis de IL-1 β e TNF- α , no hipocampo de animais submetidos ao modelo de depressão crônica induzida pelo LPS, em comparação ao grupo controle (RODRIGUES et al., 2018); aumento da IL-1 β no córtex pré-frontal de animais submetidos ao modelo de depressão-símile induzido por LPS (CORDEIRO et al., 2019; CUSTÓDIO et al., 2013), em outro experimento semelhante, utilizando o mesmo modelo, os

níveis de IL-1 β do grupo tratado com LPS foram significativamente superiores ao grupo controle no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado (TOMAZ et al., 2014).

2.6 Óxido Nítrico (NO)

Descoberto no século XVII por Jan B. Helmont e estudado por muitos anos por Joseph Priestley o Óxido Nítrico (NO) era considerado apenas como um poluente atmosférico diretamente ligado a chuva ácida, a destruição da camada de ozônio e a formação de compostos oncogênicos até o final da década de 70 (CHATKIN, 2000). Na descoberta inicial, do envolvimento da molécula no organismo humano, descreveu-se que endotélio da aorta libera uma substância que medeia a dilatação produzida pela acetilcolina (ACh) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Essa substância foi denominada fator de relaxamento dependente do endotélio EDRF e foi posteriormente identificada como NO (EPSTEIN; MONCADA; HIGGS, 1993).

Classificado como um radical livre e gasoso em temperatura ambiente, inorgânico, incolor, com cinco elétrons de nitrogênio e seis de oxigênio, sendo um desses elétrons desemparelhado, altamente reativo devido à presença de radical livre, o NO tem uma meia vida relativamente curta, após o diluído ocorre à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato (BREDT; SNYDER, 1992). Acreditasse que constituiu um mecanismo de defesa fundamental para microorganismo primitivos, desempenhando assim, um papel fundamental nos primeiros estágios da evolução (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

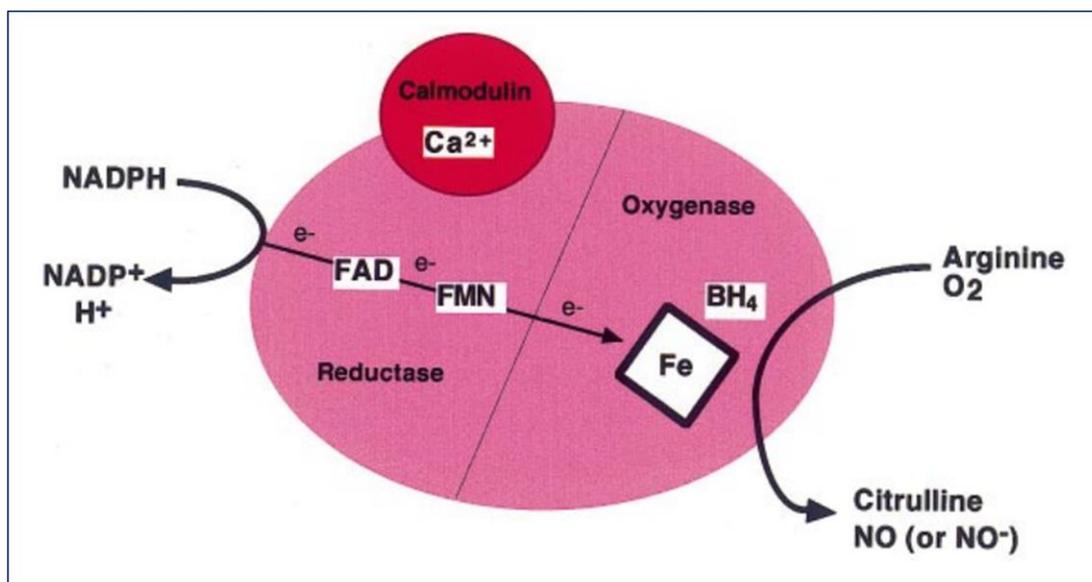
Na década de 80, surgem os primeiros estudos com ênfase na descoberta que os óxidos nitrogenados são produto do metabolismo de mamíferos, essa descoberta ganha força e sua importância é ressaltada após a descoberta do NO e que o mesmo era produzido endogenamente, a molécula em questão se tratava do óxido nítrico (IGNARRO, 1989; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Os estudos relacionados a molécula foram se ampliando e outros trabalhos evidenciaram liberação de EDRF das células cerebelares após a ativação com NMDA, além da possibilidade de que a via L-arginina/NO agisse no sistema nervoso central (SNC) (GARTHWAITE et al., 1989).

Fisiologicamente, o NO é produzido pela oxidação de L-arginina em um mecanismo dependente de NADPH, catalisado por uma enzima chamada Óxido Nítrico Sintase (NOS) contendo heme, que por sua vez ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC), responsável pela conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A expressão nos tecidos é mediado por três isoformas distintas, que são:

Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS), ou NOS1 , Óxido Nítrico Sintase Indutase (iNOS) ou NOS2 e Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) ou NOS3 , foram correlacionadas respectivamente com desenvolvimento e diferenciação de tecidos neuronais, angiogênese bem como resposta inflamatória (KNOWLES; MONCADA, 1994).

Todas as isorformas da NOS contêm um domínio da N-terminal oxigenase e um domínio de C-terminal redutase ligado por uma sequência de ligação de calmodulina central (CaM). Os domínios de redutase das proteínas NOS (Figura 4) possuem os sítios de ligação para nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e mononucleotídeo de flavina-adenina (FMN) que estão relacionados com muitas outras enzimas (redutases) de flavoproteínas . Por outro lado, os domínios da oxigenase da NOS não apresentam semelhança significativa na sequência com outras proteínas, sendo conservados os sítios de ligação: heme (Fe), tetra-hidrobiopterina (H₄B) e arginina (arg) (CHEN; WU, 2000). A ativação das isoformas de NOS constitutivamente expressas , nNOS e eNOS, é dependente da concentração de Ca²⁺ intracelular . Em contraste, a expressão de iNOS é independente de Ca²⁺ e induzida por respostas endotóxicas ou inflamatórias (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; CAMPBELL et al., 2014).

Figura 4: Reação global catalisada e cofatores de NOS.



Fonte: (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001)

2.7 Depressão e NO

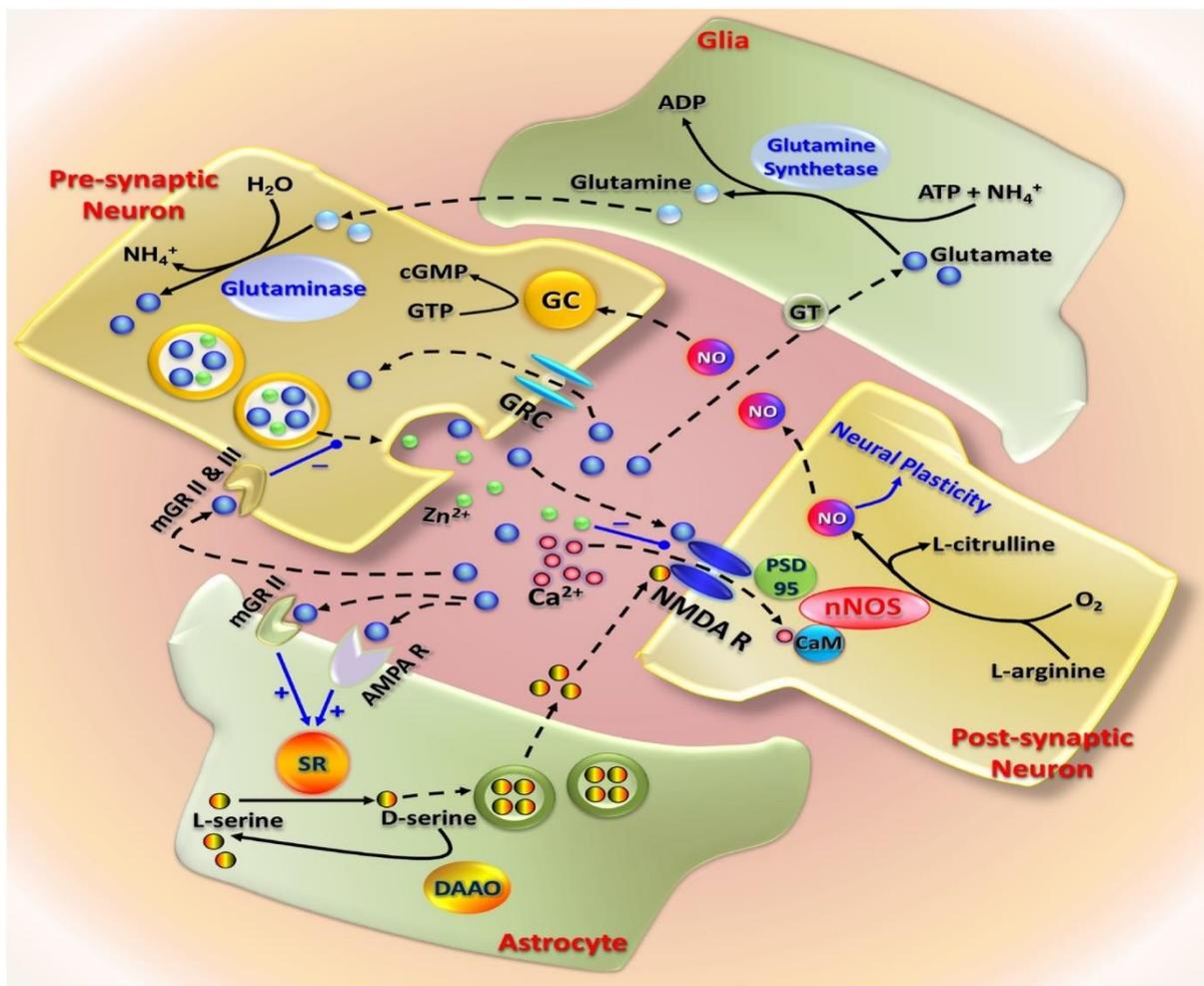
Evidências apontam para o importante papel do NO na memória, aprendizagem, além de elevada relevância na plasticidade sináptica (PITSIKAS, 2015; PRAST; PHILIPPU, 2001). No cérebro, promove a diferenciação neuronal e apresenta efeitos duradouros através da regulação dos fatores de transcrição e na expressão gênica (CALABRESE et al., 2007). Estudos apontam para o fato de baixas concentrações de NO serem neuroprotetoras e mediarem a sinalização fisiológica, como a neurotransmissão e/ou vasorelaxamento, enquanto as doses mais elevadas medeiam ações imunológicas/inflamatórias que são neurotóxicas (CALABRESE et al., 2007).

O NO está envolvido indiretamente na regulação da liberação de diferentes neurotransmissores. Estimulando a liberação de acetilcolina (ACh) no prosencéfalo basal e estriado ventral, estimulando neurônios glutamatérgicos adjacentes (PRAST; PHILIPPU, 2001). Outro fato já conhecido é que quando ocorre elevação nas concentrações basais de NO, ocorre um aumento no efluxo de receptores GABA em processos dependentes de Ca^{2+} e sódio (Na^+) (PRAST; PHILIPPU, 2001).

Em suma, o aumento nas concentrações de NO pode ocasionar: indução na morte neural por meio de stress oxidativo, através da geração intermediária de espécies reativas de oxigênio e comprometimento de sistemas antioxidantes (SALGO et al., 1995), a neurotoxicidade (DAWSON et al., 1991), pode estar envolvido na neurodegeneração por meio de uma reação não enzimática com o ânion superóxido (O_2^-), formando o peroxinitrito (ONOO^-), um agente oxidante reativo e excessivamente potente (HIBBS et al., 1988).

Acredita-se que o NO desempenha um importante papel como neurotransmissor e neuromodulador no SNC. Tanto eNOS e iNOS foram encontrados no SNC, sendo a nNOS a principal enzima responsável pela produção de NO neuronal, os neurônios que contêm a nNOS estão presentes em diversas áreas do SNC, destacando-se o cerebelo e hipocampo (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990). Dessa forma fica claro que a síntese de NO é fundamental na regulação da atividade dos neurotransmissores no SNC através de uma cascata complexa, evidenciada na Figura 5.

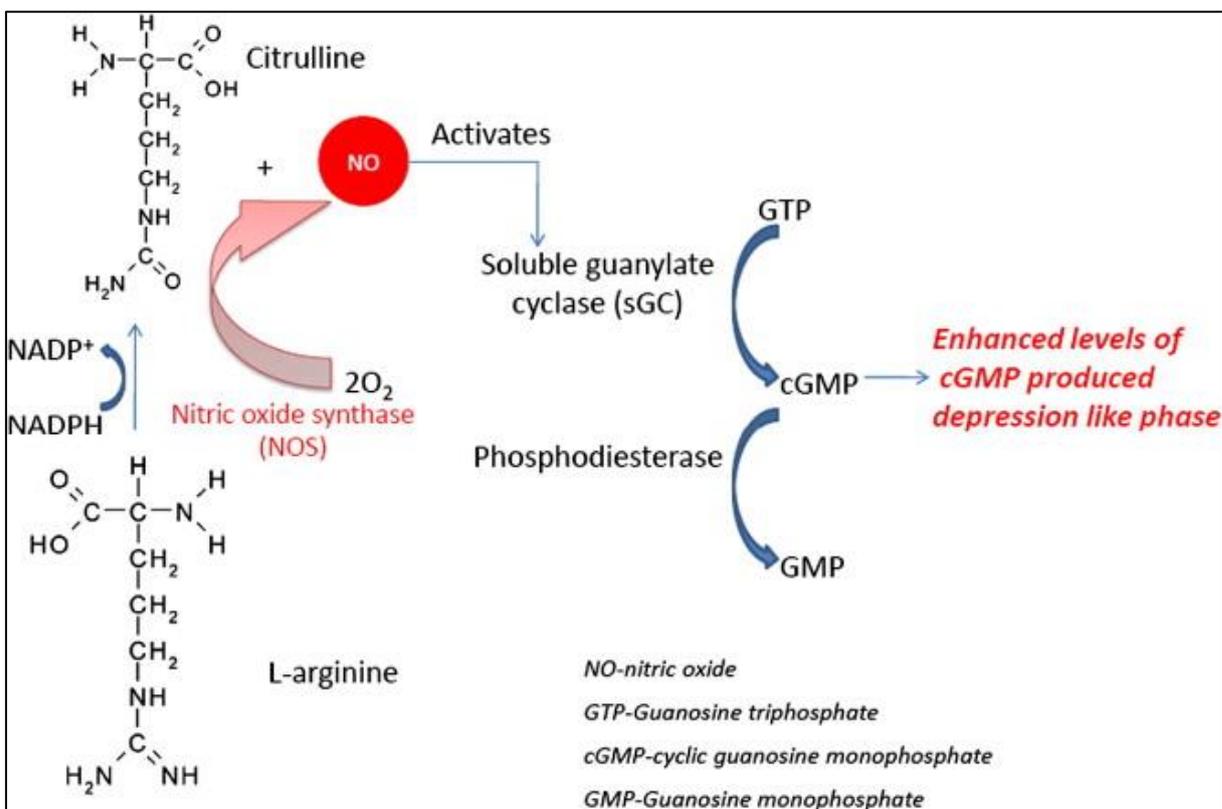
Figura 5: Via glutamatergica/NO no sistema nervoso central.



Fonte: (GHASEMI; CLAUNCH; NIU, 2018).

O NO desempenha um importante papel na plasticidade neural e pode até mesmo se difundir de volta ao terminal pré-sináptico, no qual a enzima guanilil ciclase (GC) solúvel é por muito tempo considerada o alvo principal do NO neuronal. A liberação de glutamato do espaço extracelular ocorre através dos transportadores de glutamato de alta afinidade (GTs) apresentados na glia e neurônio pré-sináptico. Os GTs desempenham um papel fundamental na manutenção da função neuronal adequada, reduzindo os níveis de glutamato extracelular potencialmente tóxico (GHASEMI; CLAUNCH; NIU, 2018).

Figura 6: Síntese das vias do óxido nítrico e da L -arginina-óxido nítrico-cGMP.



Fonte: (DHIR; KULKARNI, 2011)

Sabe-se que os níveis excessivos de GMPc podem produzir um comportamento semelhante à depressão e a redução de seus níveis produz uma tipo antidepressiva (HEIBERG; WEGENER; ROSENBERG, 2002). Os níveis de cGMP podem ser diminuídos inibindo a sGC, fato que poderia ocorrer utilizando azul de metileno ou a enzima NOS. O cGMP é degradado em monofosfato de guanosina (GMP) com a ajuda de enzima fosfodiesterase (PDE). Dessa, inibir a PDE usando seus inibidores pode aumentar os níveis de GMPc e produzir um estado semelhante à depressão, em contra partida, o sildenafil, um inibidor da PDE, é descrito como um agente com ação semelhante ao antidepressivo (TOMAZ et al., 2014).

Quadro 03: Efeitos do tipo antidepressivo de vários inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) e da variedade de experimentos comportamentais em animais

Substância	Efeito	Modelo de Depressão	Referência (MAES, 1999)
L-NA (N ^G -nitro-L-arginina)	Inibidor não seletivo de NOS	TSC	(DA SILVA et al., 2000)
		TNF	(ERGÜN; ERGÜN, 2007; HEYDARPOUR et al., 2016)
		TNF	(HARKIN et al., 2003; GIGLIUCCI et al., 2010)
L-NAME (N ^G -nitro-L-arginina metil éster)	Inibidor não seletivo de NOS 993855674	Depressão induzida por estresse leve imprevisível crônica em ratos	(LIAN; AN, 2010)
		TNF e TSC na depressão induzida por LPS	(TOMAZ et al., 2014)
		mTNF em desespero induzido por colite	(HEYDARPOUR et al., 2016)
7-NI (7-nitroindazole)	Inibidor seletivo de nNOS	TNF	(DA SILVA LEAL et al., 2017; PATIL; SINGH; KULKARNI, 2005)
		TSC após estresse leve crônico	(NEIS et al., 2014)
		TNF em estresse variável crônico	(ALMEIDA et al., 2015)
1400W	Inibidor seletivo de iNOS	TNF	(DA SILVA LEAL et al., 2017)

Fonte: (GHASEMI; CLAUNCH; NIU, 2018) – Adaptado

2.8 Tratamento para Depressão

Os resultados do ensaio STAR * D demonstraram que, apesar de quatro ensaios consecutivos de antidepressivos, quase um terço do total de participantes não conseguiu alcançar a remissão na conclusão do estudo (WARDEN et al., 2007). Outras intervenções, como a psicoterapia, ainda produzem apenas modestos tamanhos de efeito (KAMENOV et al., 2017). Dadas as limitações inerentes à farmacoterapia e à psicoterapia, a estimulação cerebral não invasiva representa um importante “terceiro” braço de tratamento para lidar com a carga onerosa de transtornos psiquiátricos.

2.8.1 Tranilcipromina

A tranilcipromina (trans-2-fenilciclopropilamina, TCP) é um antidepressivo, pertencente ao grupo farmacológico dos inibidores da monoamina oxidase (IMAO). A sua estrutura química é composta por três grupos elementares (anel de benzeno, anel de ciclopropano e um grupo amino). Apesar de sintetizado pela primeira vez na década de 1940 como um análogo das anfetaminas, a referida droga não foi investigada devido a baixa atividade anfetamínica (BURGER; YOST, 1948).

O primeiro estudo clínico foi publicado em 1959, no qual relatava que 52 pacientes do sexo feminino com "Vários tipos de depressão", receberam doses de TCP entre 30-40 mg/dia, 21 pacientes obtiveram remissão total dos sintomas e 15 pacientes reduziram consideravelmente os sintomas (PETERSEN; MCBRAYER, 1959).

O tratamento com TCP reduziu a imobilidade no teste de nado forçado, relativamente aos comportamentos de natação e escalada (TORREGROSSA et al., 2005). Em outro estudo, a TCP aumentou os níveis de norepinefrina e serotonina no cérebro, sem inibir seus respectivos transportadores, neste estudo análise do comportamento no teste de nado forçado, apresentou dados semelhantes aos Inibidores Seletivos da Recapitação de Serotonina (ISRS) (REED et al., 2008).

4.8.2 Amitripitilina

Os antidepressivos tricíclicos impedem a captação de serotonina e norepinefrina, além de ter atividade anti-histaminérgica e anticolinérgica. O grau de bloqueio da recaptura de monoamina varia de acordo com o antidepressivo desta classe (GILLMAN, 2007).

A Amitriptilina é um potente inibidor da recaptação da serotonina e um inibidor moderado da recaptação da norepinefrina, é metabolizado em nortriptilina, que tem um maior efeito no transportador de norepinefrina. Além de ter ação no receptor adrenérgico alfa1, nos receptores muscarínicos de acetilcolina e receptores de histamina H1 e H2. Também bloqueia os canais de sódio, cálcio e potássio (AYATA et al., 2006). Um outro mecanismo possível de ação da amitriptilina é o aumento das vias nociceptivas inibitórias descendentes (SPRENGER; VIANA; TASSORELLI, 2018).

Em um estudo pré-clínico, a amitriptilina foi capaz de exercer efeitos antidepressivos no teste de nado forçado em ratos submetidos aos protocolos de estresse leve e de privação materna crônica, vale ressaltar que a droga demonstrou ação neuroprotetora através do aumento das atividades na superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (MACIEL et al., 2018).

4.8.3 Escitalopram

O escitalopram (*S*- citalopram) é o um potente inibidor seletivo para transporte de serotonina. Além disso, é um antidepressivo de ação dupla que se liga tanto ao sítio primário no transportador de serotonina quanto a um sítio alostérico secundário de baixa afinidade, que pode, em teoria, estabilizar e prolongar a ligação do fármaco ao sítio primário (OWENS; KNIGHT; NEMEROFF, 2001).

Ao ser comparado com a Velafaxina, o Escitalopram , reproduziu padrões de reversão iguais (MONTGOMERY; HUUSOM; BOTHMER, 2004) ou superiores a Venlafaxina (BIELSKI; VENTURA; CHANG, 2004). Seus efeitos foram geralmente mais bem tolerado que a venlafaxina no tratamento de pacientes com depressão moderada a severa (BIELSKI; VENTURA; CHANG, 2004; MONTGOMERY; HUUSOM; BOTHMER, 2004). Eventos adversos emergentes do tratamento foram relatados por 67% (MONTGOMERY; HUUSOM; BOTHMER, 2004) e 68% (BIELSKI; VENTURA; CHANG, 2004) dos pacientes com escitalopram versus 71% (MONTGOMERY; HUUSOM; BOTHMER, 2004) e 85% (BIELSKI; VENTURA; CHANG, 2004) dos pacientes tratados com venlafaxina XR nos estudos acima.

4.8.4 Vortioxetina

A vortioxetina é um antidepressivo farmacodinamicamente novo, definido como um multimodal, que exerce efeitos nos sistemas ergo e glutamatérgico serotoninérgicos, noradrenérgicos, histaminérgicos, colinérgicos, GABA (ácido gama-aminobutírico)

(demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo*). Conseqüentemente, os estudos pré-clínicos sugerem que a droga pode exercer não apenas atividade antidepressiva e ansiolítica, mas também pode melhorar as funções cognitivas. Uma série de modelos e testes animais mostraram que a vortioxetina pode melhorar a memória trabalhando e episódica, bem como a flexibilidade cognitiva e a memória espacial. Estas propriedades da vortioxetina são particularmente relevantes devido ao fato de que a disfunção cognitiva é uma comorbidade comum para Depressão Maior (BORTOLATO et al., 2016).

Pertencente à classe de bis-aril-sulfanilaminas, a Vortioxetina é quimicamente identificada como 1-[2-(2,4-dimetil-fenilsulfanil)-fenil]-piperazina. O mecanismo de ação da vortioxetina é considerado como relacionado à sua atividade multimodal, ou seja, bloqueio seletivo da recaptação da serotonina (inibindo o transportador de serotonina [SERT]) e modulação direta da atividade dos receptores de serotonina (5-HT) (D'AGOSTINO; ENGLISH; REY, 2015).

A base de evidências atuais, sugerem que a vortioxetina pode ser efetiva em pacientes com Depressão Maior, no entanto, esses achados precisam ser interpretados com cautela, devido à heterogeneidade substancial dos resultados, risco considerável de viés na maioria dos ensaios e escassez de comparação direta entre a droga de interesse e outros antidepressivos (CITROME, 2016; LLORCA et al., 2014).

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Qual a relação entre antidepressivos utilizados na prática clínica com as alterações neuroimunes induzidas no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos?
2. Qual a relação entre os inibidores das isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) com as alterações neuroimunes induzidas no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos?

4 HIPÓTESES

1. Antidepressivos utilizados na prática clínica, alteram os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no cérebro de roedores, submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS.
2. As Isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) central, exercem papel determinante gênese da depressão em roedores, submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Avaliar a ação de antidepressivos utilizados na prática clínica, de diferentes classes farmacológicas e de inibidores das Isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) nas alterações neuroimunes no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos.

5.2 Específicos

5.2.1 Objetivos específicos do protocolo 1

- Verificar alterações comportamentais após administração repetida de antidepressivos de diferentes classes no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em roedores, utilizando os testes de campo aberto, nado forçado e splash test;

- Avaliar, em diferentes áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) dos animais desafiados com LPS e pré-tratados com os antidepressivos de diferentes classes, parâmetros relacionados à ativação de células gliais como nitrito e IL-1 β ;

- Determinar alterações em citocinas relacionadas a resposta Th1, IFN- γ e TNF- α , nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo), após administração repetida de antidepressivos de diferentes classes no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos;

- Avaliar citocinas relacionadas a resposta Th2, IL-4 e IL-6, nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo), após administração repetida de antidepressivos de diferentes classes no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos;

5.2.2 Objetivos específicos do protocolo 2

- Verificar alterações comportamentais após administração de inibidores das Isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em roedores, utilizando os testes de campo aberto, nado forçado e preferência por sacarose;

- Observar alterações em mediadores relacionados a ativação de células gliais, como atividade da Mieloperoxidase (MPO), nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo), em ratos machos após administração de inibidores das Isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos;

- Determinar alterações em citocinas relacionadas a resposta Imune Th1, IFN- γ e TNF- α , nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo, após administração de inibidores das Isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos;

- Avaliar citocinas relacionadas a resposta Imune Th2, IL-4 e IL-6, nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo após administração de inibidores das Isoformas da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no modelo de depressão induzido pela administração sistêmica de LPS em ratos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos (peso: 250-300 g) obtidos a partir do Biotério da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram alojados 02 por gaiola em gaiolas de policarbonato padrão (42 × 20,5 × 20 cm) e condições ambientais padrão (22 ± 1 ° C; umidade 60 ± 5%; ciclo inverso de 12 horas claro / escuro com luz acesa às 19: 00) com acesso a alimentos (FRI-LAB Rato II, FRI-Ribe) e água *ad libitum* . Todos os procedimentos experimentais foram realizados entre as 8:00 e as 14:00 he foram realizados de acordo com o Guia do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2010) e o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de ética local da Universidade Federal do Ceará.

6.1 Protocolo 1

6.2.1 Drogas

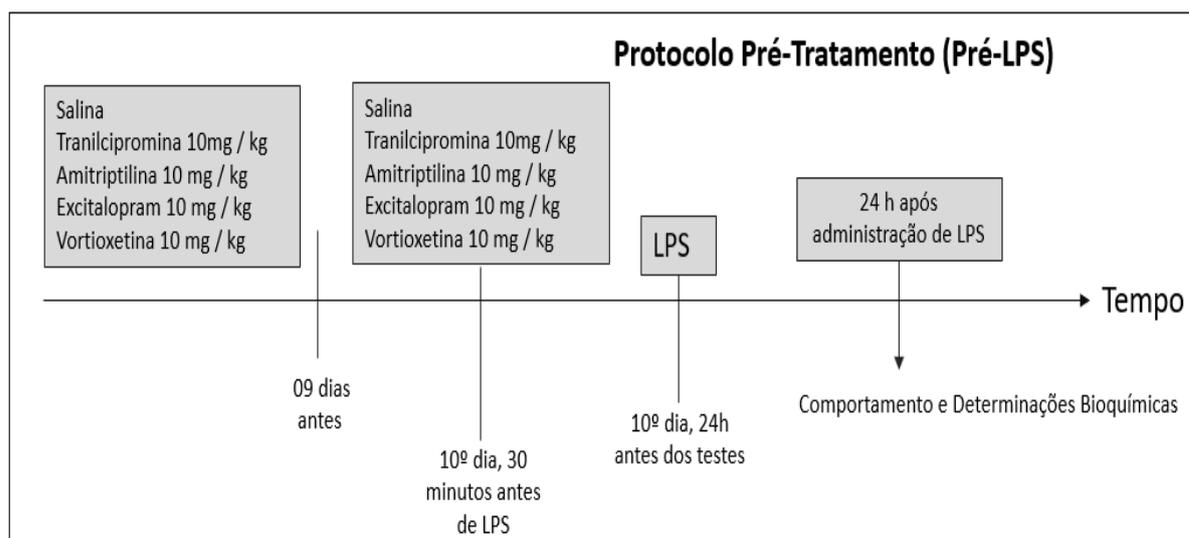
Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* , cepa 055: B5 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, EUA), tranilcipromina (TCP; Sigma-Aldrich Corp., St Louis, EUA), amitriptilina (AMIT; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA), escitalopram (ESC; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA) e vortioxetina (VORT; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA), foram utilizados. As drogas foram preparadas imediatamente antes da administração, diluídas em solução salina estéril. As soluções foram administradas em um volume de 0,1ml a cada 10g de peso corporal. Todos os outros produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

6.2.2 Desenho experimental

Os ratos foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais de oito animais. Foram pré-tratados por dez dias com, Tranilcipromina 10mg / kg (Grupo TCP+LPS) (REED et al., 2008), Amitriptilina 10 mg/kg (Grupo AMI+LPS) (MACIEL et al., 2018), Escitalopram 10 mg/kg (Grupo ESC+LPS) (HADUCH et al., 2018; SEO; LEE; PARK, 2019), Vortioxetina 10 mg/kg (Grupo VORT+LPS) (HLAVACOVA et al., 2018) ou solução salina (Grupo SALINA+LPS) (sem endotoxina) foram administrados por via oral (v.o.), no décimo dia os animais foram tratados com LPS (0,83 mg / kg, ip) (CHOUBEY et al., 2019; DOMINGUES et al., 2018; MILLETT; PHILLIPS; SAUNDERS, 2019; SALAZAR et al., 2012), trinta minutos após a administração da droga/solução correspondente ao seu grupo. No Grupo CONTROLE, os animais foram pré-tratados por dez dias com Solução Salina (v.o.), no décimo dia receberam uma dose de Solução Salina (i.p.)

As determinações comportamentais foram realizadas 24 h após a administração de LPS, período em que se observa a ocorrência de comportamento depressivo (DANTZER et al., 2008; OHGI et al., 2013). Para evitar a potencial influência do teste comportamental nos níveis de citocinas, foram realizadas avaliações de citocinas e testes comportamentais em diferentes animais (BOSSÙ et al., 2012)

Figura 8: Desenho Experimental – Protocolo 1



Fonte: A própria Autora.

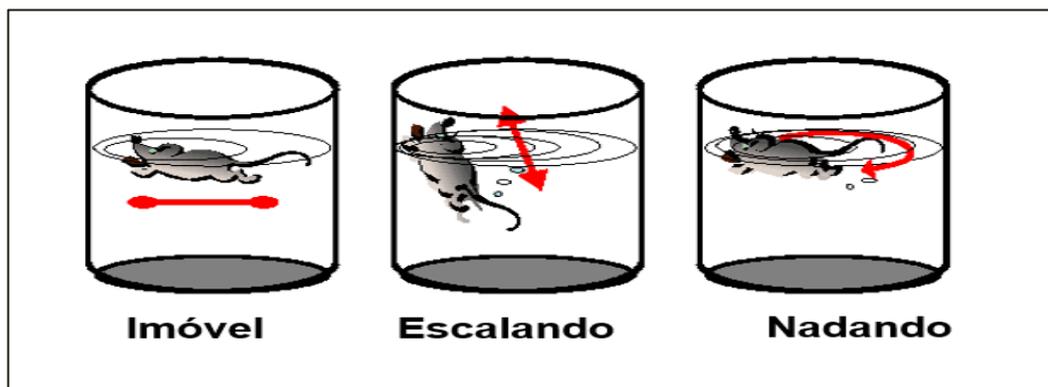
Os animais utilizados para determinações neuroquímicas foram mortos por decapitação. As áreas do cérebro dissecadas foram: o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e hipotálamo (HT). Todo o material biológico foi imediatamente armazenado a -80°C até o ensaio. Uma visão esquemática do desenho experimental está representada na figura 8.

6.2.3 Testes comportamentais

6.2.3.1 Teste de Nado Forçado

O procedimento experimental consiste em colocar os animais individualmente em cilindros plásticos (altura- 35 cm; diâmetro- 24 cm), contendo 13,5 cm de água, por um período de 5 min no qual é registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, além da latência para apresentação de tal comportamento, a partir do segundo minuto e o comportamento de *climbing*. Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. O *climbing* é definido como o comportamento de escalada do animal com suas patas dianteiras contra as paredes do cilindro (PORSOLT et al., 1978).

Figura 9: Teste do Nado Forçado



Fonte: (NIE et al., 2008)

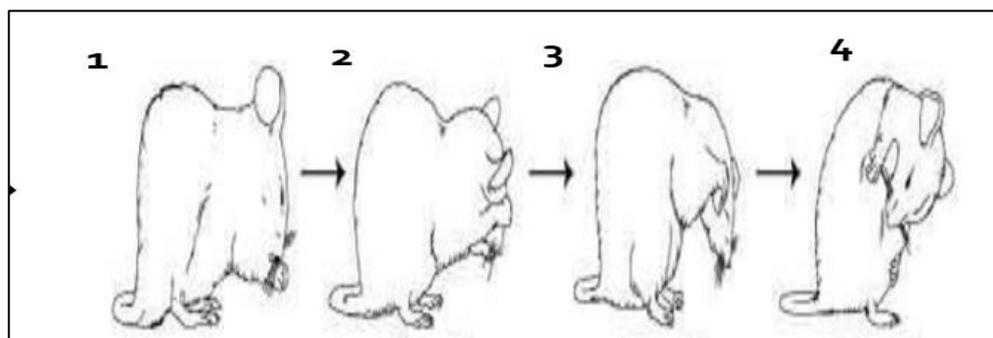
6.2.3.2 Teste do Campo Aberto

Com a finalidade de analisar os efeitos do tratamento com LPS sobre a atividade locomotora, os animais foram avaliados no teste do campo aberto. A arena para o teste é feita de acrílico (40 x 60 x 50 cm) com o chão dividido em nove quadrados iguais. A atividade exploratória do animal será registrada durante 5 min (ARCHER, 1973). Avaliamos o número de quadrados atravessados pelo animal (Crossing).

6.2.3.3 Teste de Borrifagem de Sacarose ("SPLASH TEST")

Descrito como um robusto marcador comportamental, o "splash test", foi utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza ("grooming") dos animais, após a borrifagem dos mesmos, com solução de sacarose a 10%. No dia anterior ao teste, os animais foram colocados em caixas individuais, com intuito de evitar ansiedade no momento do teste. Para tal avaliação, cronometramos o tempo de cinco minutos, e observamos o comportamento do animal (DUCOTTET; BELZUNG, 2004). Os animais submetidos a modelos de depressão apresentam menor tempo de auto-limpeza comparados aos animais controle (MORETTI et al., 2012).

Figura 10: Movimentos de grooming.



Fonte: (BERRIDGE et al., 2005) Adaptado. 1 – Observam-se movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do nariz; 2 – Movimentos unilaterais envolvendo uma pata, que alcançam até as vibrissas; 3 – Movimentos amplos bilaterais feitos simultaneamente; 4 – Movimentos prolongados de "lambidas" do corpo

6.2.4 Dosagem de Corticosterona e IL-1 β no sangue dos animais.

A amostra foi obtida da veia lateral da cauda, coletando-se 0,6 mL de cada animal em tipo Eppendorf Heparinizados. Todas as amostras foram coletadas no período da manhã, entre 8:00 e 12:00 horas. Após o procedimento os ratos foram submetidos aos testes

comportamentais. As amostras foram centrifugadas à velocidade de 3000 rpm, à 4°C por 15 minutos. O plasma foi congelado à -80°C, até o momento da realização das dosagens de Corticosterona e IL-1 β (ANDREA; ANHUAMÁN, 2013).

6.2.4.1 Dosagem de Corticosterona

Em síntese, foram adicionados 3mL de éter etílico às amostras de plasma, sendo esta mistura agitada por 30 segundos e centrifugada a 4°C por 9 minutos a 1800 rpm. Em seguida, os tubos de ensaio contendo as amostras foram mantidas a -80°C por 7 min. A fase líquida foi então transferida para novos tubos de ensaio, os quais foram mantidos em capela de exaustão de gases para evaporação de éter, por aproximadamente 24 horas (MENDONÇA et al., 1996).

A Corticosterona foi dosada através de kits de ELISA (Cayman Chemicals, cat no 500655). Antes da realização do ensaio as amostras foram ressuspensas em tampão de ensaio. Brevemente, foram pipetados 50 μ L de calibradores da amostra (em duplicata) em cada poço da respectiva placa de 96 poços. A seguir, foram adicionados 50 μ L de antissoro específicos para o Corticosterona, sendo a placa então incubada à temperatura ambiente em um agitador orbital por 2h. As placas foram lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem após foram pipetados 200 μ L de reagente Ellman, seguindo-se de incubação em um agitador orbital por 50 min. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda 412nm. A média de coeficiente de variação intra e inter-ensaios foi 5,2 e 12,9%, respectivamente (BARSOTI, 2014).

6.2.4.2 Dosagem de IL-1 β

O plasma foi usado sem diluição. A concentração do citocinas em amostras de 50 ml foi determinada por ELISA (sistemas de I & D, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante e expresso em tecido pg / g (CUSTÓDIO et al., 2013).

6.2.5 Testes Neuroquímicos

Após administração de LPS ou salina o sangue venoso periférico dos animais foi coletado e após isto serão sacrificados por decaptação e as áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) retiradas e imediatamente acondicionadas em temperatura a -80°C para realização das análises neuroquímicas.

6.2.5.1 Determinação do conteúdo de nitrito

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes são coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi incubada com 100 µl do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H₃PO₄ 1 %/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/ H₃PO₄ 1 % / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância é medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito (µM) será determinada a partir de uma curva padrão de NaNO₂ (ELLIS et al., 1998).

6.2.5.2 Teste de ELISA para dosagem dos níveis de INF γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-6

A detecção das citocinas foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). As áreas cerebrais dissecadas (córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e hipotálamo) foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS com inibidores de protease (EMD Biosciences) e fosfatase (SigmaAldrich) e centrifugadas (10000 rpm, 5 min). Nas placas para ELISA, contendo 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para INF γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-6 por 18h em temperatura ambiente com 100µL de anticorpo em cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200µL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1h. Após o bloqueio, 100µL 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 200µl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para INF γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-6 em temperatura ambiente por 2h. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL 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 µL solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/g tecido.

6.3 Protocolo 2

O presente protocolo buscou elucidar dúvidas suscitadas em nossos estudos anteriores, no qual avaliamos o papel do NO da depressão (TOMAZ et al., 2014). A via de administração dos inibidores da NOS foi intra cérebro ventricular (i.c.v.), para verificarmos o efeito das drogas direto no cérebro, evitando metabolização das drogas.

6.3.1 Drogas

Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, cepa 055: B5 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, EUA), cloridrato de cetamina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA), cloridrato de xilazina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA), N^w-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA), 7-nitroindazol (7-NI; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA) e N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidine (1400W; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA), foram utilizados. As drogas foram preparadas imediatamente antes da administração, diluídas em solução salina estéril. As soluções foram administradas em um volume de 0,1ml a cada 10g de peso corporal. Todos os outros produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

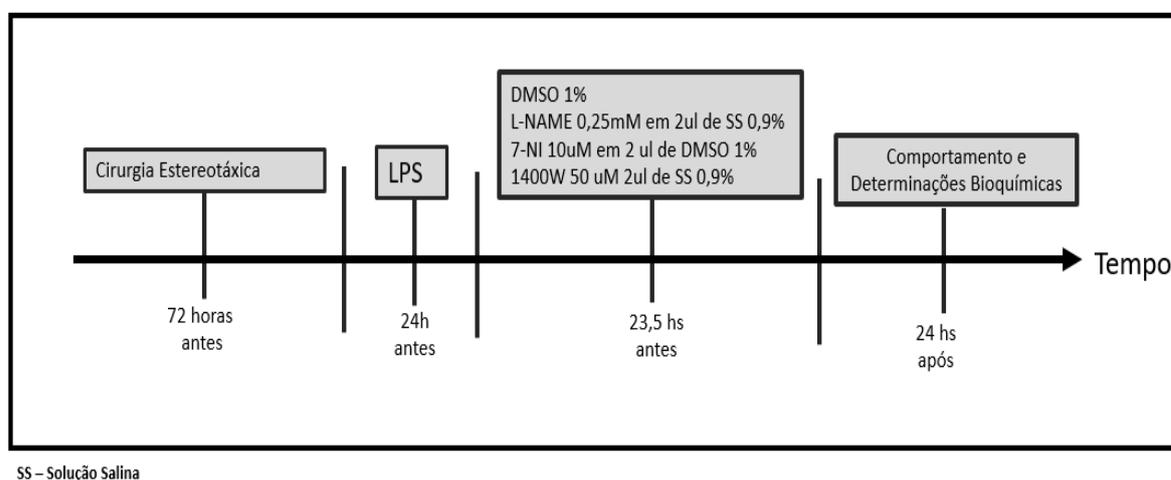
6.3.2 Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com cetamina (61 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg), submetidos à tricotomia da região superior da cabeça e, em seguida, fixados ao aparelho estereotáxico. Uma incisão de, aproximadamente, 2 cm de comprimento foi realizada com um bisturi na parte superior do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, a fim de encontrar o bregma (junção entre as suturas sagital e coronal). Realizamos perfurações bilaterais de acordo com as coordenadas a partir do bregma: -9mm anterior/posterior; -1,5mm medial/lateral; -3,3 dorsal/ventral. Em seguida, implantamos cânulas bilaterais (22 ga) nos ventrículos laterais (PAXINOS; WATSON, 1986). Suturamos a incisão com fio náilon 3.0 e então colocamos o animal em uma caixa de polipropileno sob luz vermelha para manutenção da temperatura corpórea e recuperação. Aguardamos 72 horas para realizar o protocolo experimental. Os animais do grupo falso operado (FO) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, sendo introduzidas as cânulas nas mesmas coordenadas estereotáxicas, e a posterior infusão do mesmo volume de veículo estéril dimetil sulfoxido (DMSO).

6.3.3 Desenho experimental

Os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais de oito animais. Realizou-se a cirurgia Estereotáxica, após 72 h, tempo para o animal se recuperar do procedimento, os animais receberam uma dose de LPS (0,83 mg / kg, ip) (CHOUBEY et al., 2019; DOMINGUES et al., 2018; SALAZAR et al., 2012), após trinta minutos receberam uma dose de N^w-nitro-arginina-metil-ester 0,25mM diluído em 2ul de solução salina 0,9% (Grupo LPS+L-NAME), 7-Nitridazol 10uM diluído em 2 ul de DMSO 1% (Grupo LPS+7-NI) e N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidine 50 uM diluído em 2ul de solução salina 0,9% (Grupo LPS+1400W). No Grupo controle, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica, receberam uma dose de solução salina i.p e trinta minutos após, pré-tratados por nove dias com Solução Salina (vo), no décimo dia receberam uma dose de Solução Salina (ip) e trinta minutos após foi infundido 2ul DMSO 1% i.c.v, Uma visão esquemática do desenho experimental está representada na figura 11.

Figura 11: Desenho Experimental – Protocolo 2



Fonte: A própria autora.

6.3.4 Testes comportamentais

6.3.4.1 Teste de Nado Forçado

Descrito no Protocolo 1.

6.3.4.2 Teste do Campo Aberto

Descrito no Protocolo 1.

6.3.4.3 Teste de preferência pela sacarose (PPS)

Toda semana, rigorosamente no mesmo dia e horário, foi avaliada a ingestão de sacarose (solução de 0,8%) como medida de anedonia, através de um teste de preferência. Para tanto, inicialmente as garrafas de água pura e solução de sacarose (peso inicial) foram pesadas. Após esse procedimento foi oferecido as duas garrafas para os camundongos por um período de 24 horas e depois disto será pesado novamente as garrafas (peso final). O consumo, tanto de água como de sacarose será calculado pela diferença entre os pesos inicial e final. A preferência (vista na fórmula abaixo) calculamos em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e o consumo total (consumo de água (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de água) + consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e multiplicando-o por 100 (MONLEON et al., 1995).

$$\text{Preferência} = \frac{\text{Consumo de Sacarose}}{\text{Consumo de Sacarose} + \text{Consumo de Água}} \times 100$$

6.3.5 Testes Neuroquímicos

Descrito no Protocolo 1.

6.3.5.1 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente nos grânulos de neutrófilos. Ela é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração de neutrófilos dos tecidos. Neste ensaio, a H₂O₂ é clivada por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio (O⁻) resultante se combina com diidrocloreto de θ-

dianisidina que é convertido a um composto colorido. Para avaliar o aparecimento deste composto, ao longo do tempo, utilizamos o espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio (BRADLEY, 1982). Imediatamente após a decapitação, as áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e hipotálamo) 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 θ -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).

6.3.5.2 Teste de ELISA para dosagem dos níveis de $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-4 e IL-6

Descrito no Protocolo 1.

6.4 Análise estatística dos resultados

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 8.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. Todos os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey, como teste post hoc para comparações múltiplas e expressas como média \pm EPM. Valores significativos para as análises foram considerados quando $p < 0,05$

7 RESULTADOS

PROTOCOLO 1

7.1 Avaliação da ação das drogas antidepressivas no nado forçado em ratos desafiados com LPS.

O teste de nado forçado é considerado padrão ouro utilizado para a avaliação de comportamento depressão-símile em roedores. O teste ANOVA revelou interação significativa animais tratados com antidepressivos e não-tratados, [F (5, 26) = 26.91, P = 0,0001]. Verificou-se que houve aumento significativo de imobilidade do grupo com LPS+SALINA comparado com os grupos CONTROLE, TCP+LPS, AMI+LPS, ESC+LPS e VORT+LPS. Em relação CONTROLE, observou-se aumento da imobilidade com relação aos grupos TCP+LPS e VORT+LPS. (Figura 12).

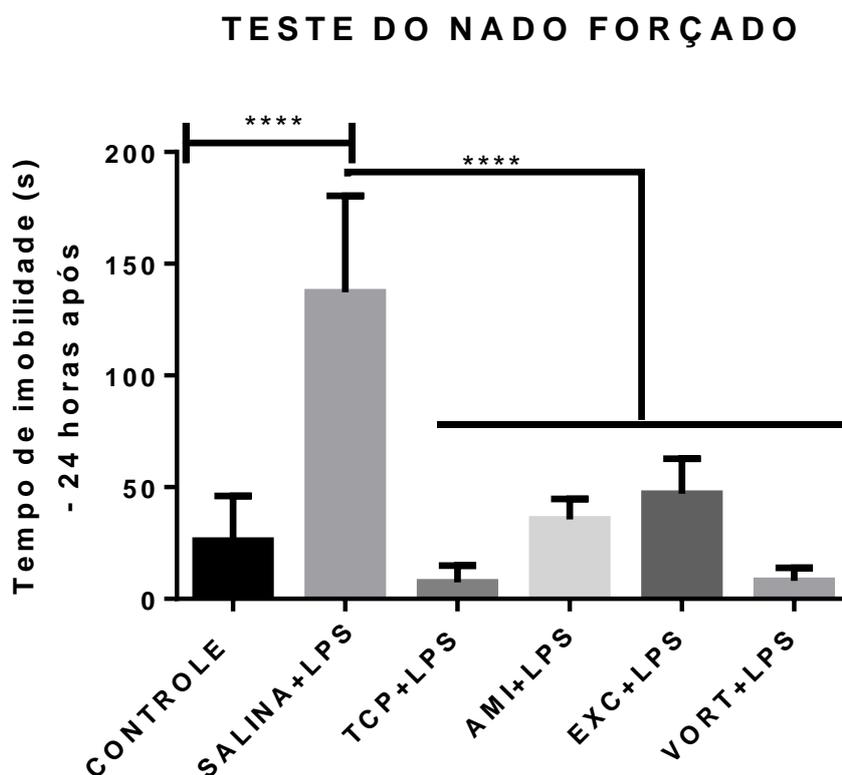


Figura 12 - Tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.2 Avaliação da ação das drogas antidepressivas no Teste de Borrifagem de sacarose ("SPLASH TEST") em ratos desafiados com LPS.

O splash test é um válido marcador de comportamento anedônico sendo usado em modelos de depressão. Nele foi avaliado o tempo de latência de grooming e tempo de grooming, representado na Figura 13. Observou-se aumento significativo no tempo de grooming do grupo VORT+LPS comparado ao grupo CONTROLE [F (5,24) = 5,522, P <0,0016] (Figura 13B).

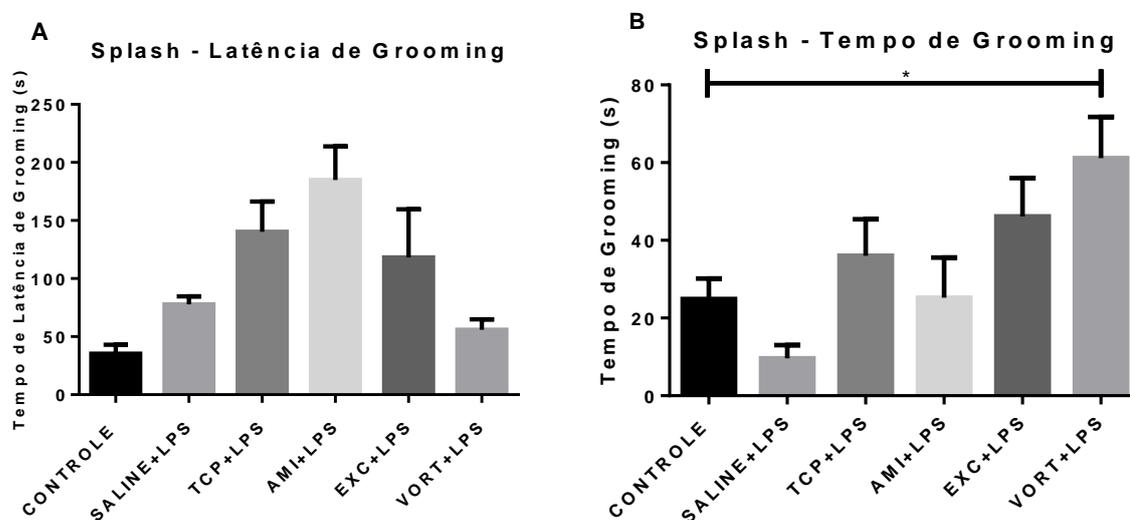


Figura 13 – Teste de Borrifagem de sacarose ("SPLASH TEST") em ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.3 Avaliação da ação das drogas antidepressivas no campo aberto em ratos expostos ao LPS.

Esse teste foi desenvolvido, sugerindo que a atividade motora do animal no campo aberto como indicadora de seu estado emocional. A baixa atividade locomotora indica a ansiedade do animal. Apenas os animais pré-tratados com TCP apresentaram aumento do número de cruzamentos em relação aos demais grupos grupo [F (5,36) = 7,697, P <0,0001].

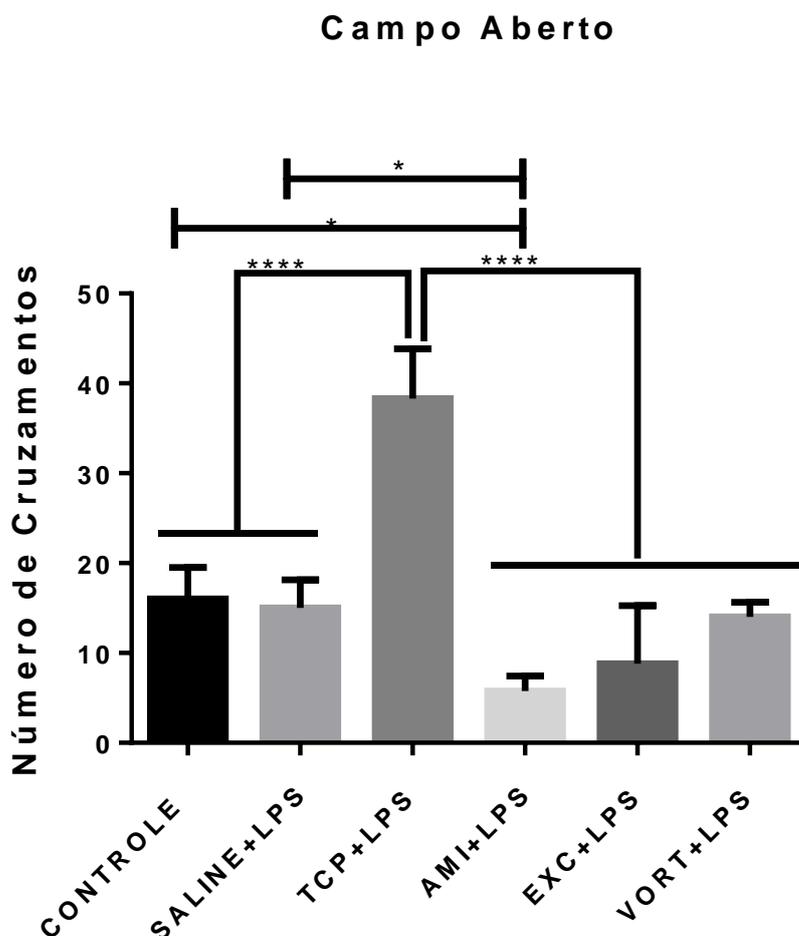


Figura 14 – Teste de Campo aberto em ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. * $P < 0,001$.

7.4 Avaliação dos níveis de IL-1 β no sangue periférico de animais tratados com drogas antidepressivas e expostos ao LPS.

Comportamento de doença (*sickness behavior*) é a expressão usada para definir alterações comportamentais desencadeadas durante um processo infeccioso. Estas alterações são consideradas como respostas adaptativas do animal com a finalidade de combater a infecção, desta forma, com intuito de descartar a possibilidade de os animais do nosso estudo estarem em *sickness behavior*, dosou-se IL-1 β do sangue periférico dos mesmos. A dosagem evidenciou que não houve diferença estatística entre os índices apresentados por nossos animais (figura 15).

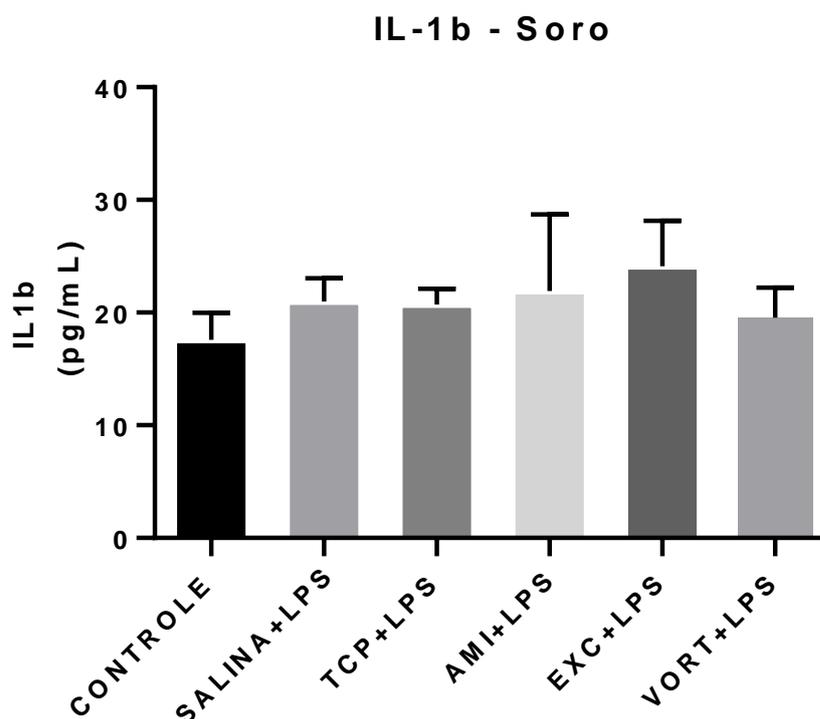


Figura 15 – Níveis de IL1- β do sangue periférico de ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.5 Avaliação dos níveis de Corticosterona no sangue periférico de animais tratados com drogas antidepressivas e expostos ao LPS.

A figura 16 apresenta os níveis de corticosterona no soro dos animais, houve aumento significativo dos níveis dos grupos SALINA+LPS e AMI+LPS em comparação ao grupo CONTROLE. O tratamento prévio com Escitalopran e Vortioxetina foi capaz de prevenir a elevação dos níveis de corticosterona, causado pela administração do LPS [F (5, 26) = 5.033, P=0,0023].

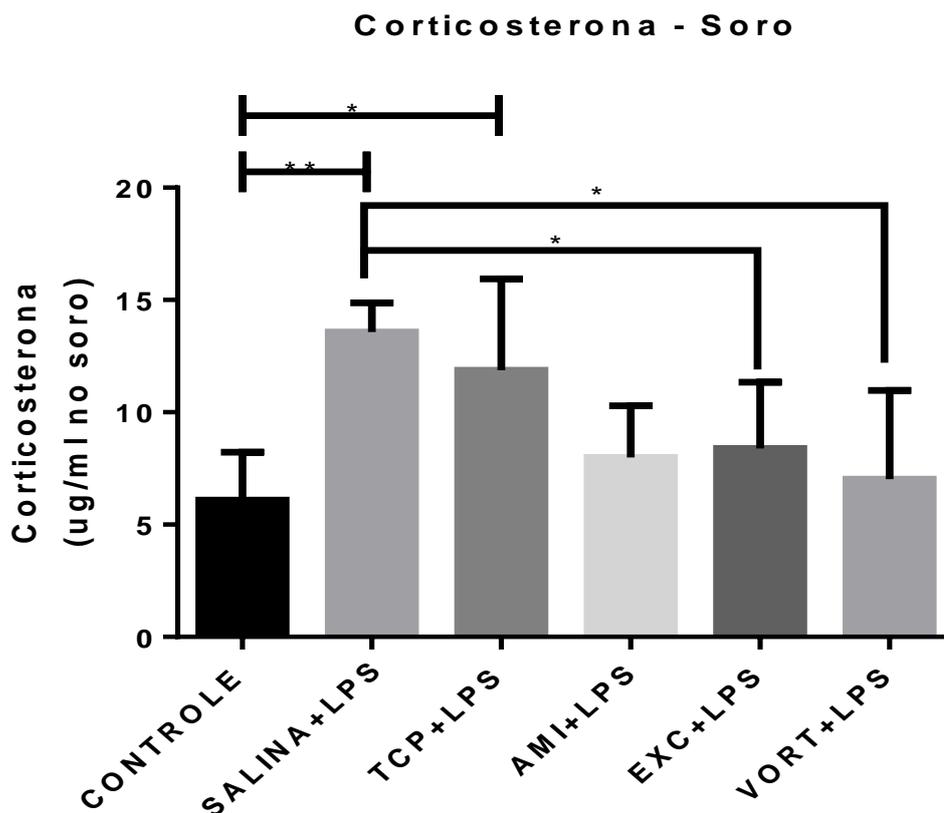


Figura 16 – Níveis de IL1- β do sangue periférico de em ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.6 Mediadores da Resposta Imune Inata

7.6.1 Avaliação da ação das drogas antidepressivas sobre as concentrações de Nitrito em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.

A figura 17 evidencia os níveis de nitrito das áreas cerebrais: córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo. No Córtex pré-frontal houve um aumento significativo dos níveis de nitrito dos grupos ESC+LPS e VORT+LPS em comparação aos grupos CONTROLE e AMI+LPS, já em comparação com o grupo SALINA+LPS apenas o grupo VORT+LPS apresentou aumento significativo (Figura 17A) [F (5, 24) = 5.095, P=0,0025]. No hipocampo (Figura 17B) o grupo VORT+LPS apresenta aumento significativo dos níveis de nitrito em comparação aos grupos CONTROLE, LPS+SALINA e TCP+LPS [F (5, 24) = 4.563,

P=0,0046]. Na figura 17C, foi verificado elevação dos níveis de nitrito no corpo estriado, do grupo AMI+LPS em comparação aos grupos CONTROLE e TCP+LPS [F (5, 24) = 4.730, P=0,0038]. No Hipotálamo (Figura 17D) ocorre aumento significativo do grupo SALINA+LPS em comparação ao grupo CONTROLE e redução dos níveis de Nitrito dos grupos TCP+LPS, AMI+LPS, ESC+LPS e VORT+LPS em comparação ao grupo SALINA+LPS [F (5, 27) = 31.09, P=0,0001].

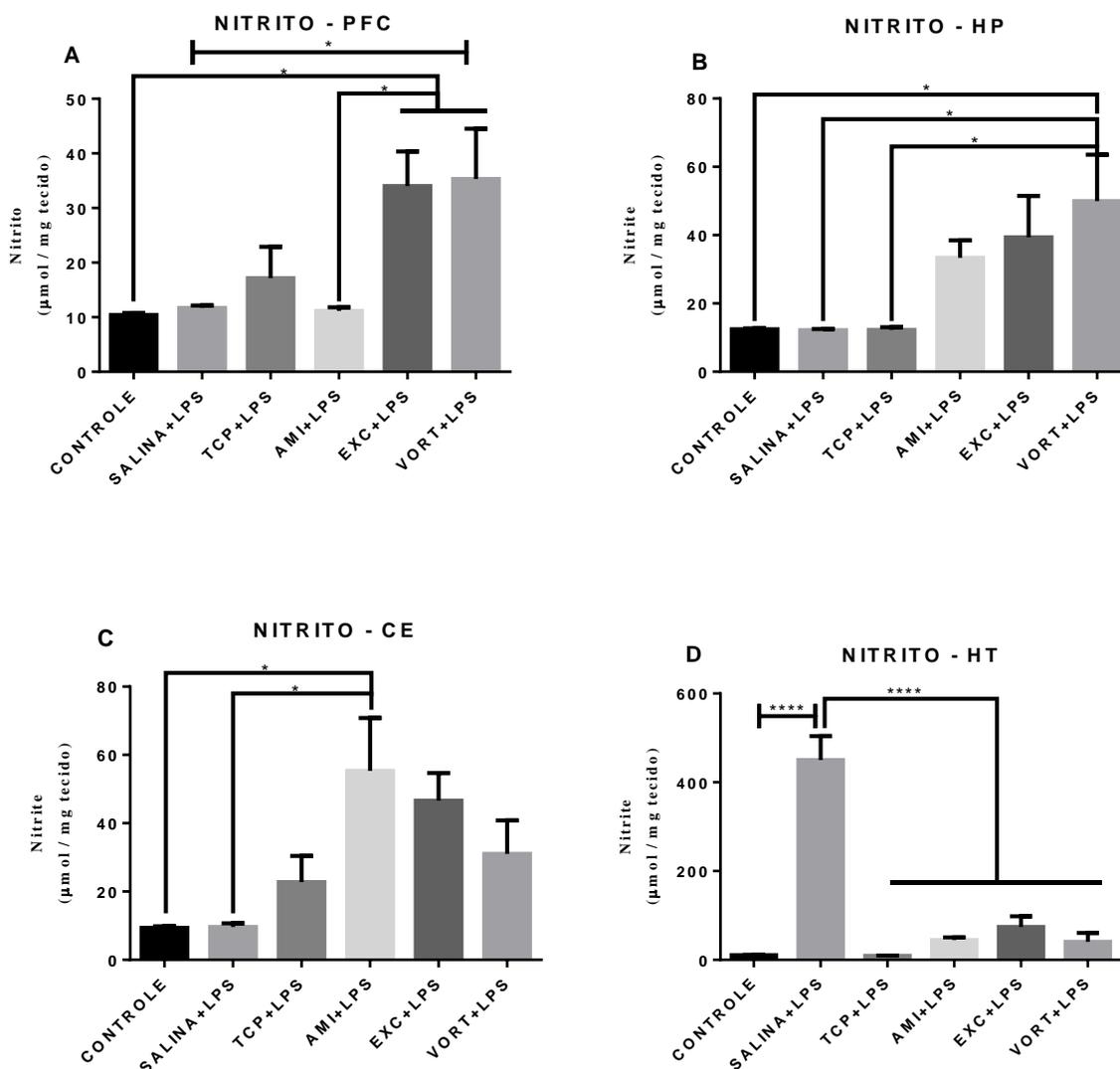


Figura 17 – Níveis de Nitrito em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média ± EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.6.2 Avaliação da ação das drogas antidepressivas sobre as concentrações de IL-1 β em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.

A administração de LPS promoveu um aumento significativo nos níveis de IL1 β quando comparado com o grupo controle nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo (Figuras 18A, 18B e 18D). Todos os grupos tratados com antidepressivos foram capazes de prevenir o aumento dos níveis de IL-1 β em decorrência da administração de LPS nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal [F (5, 24) = 36.65, P=0,0001], hipocampo [F (5, 24) = 4.219, P=0,0068] e hipotálamo [F (5, 21) = 12.49, P=0,0001] (Figuras 18A, 18B e 18D).

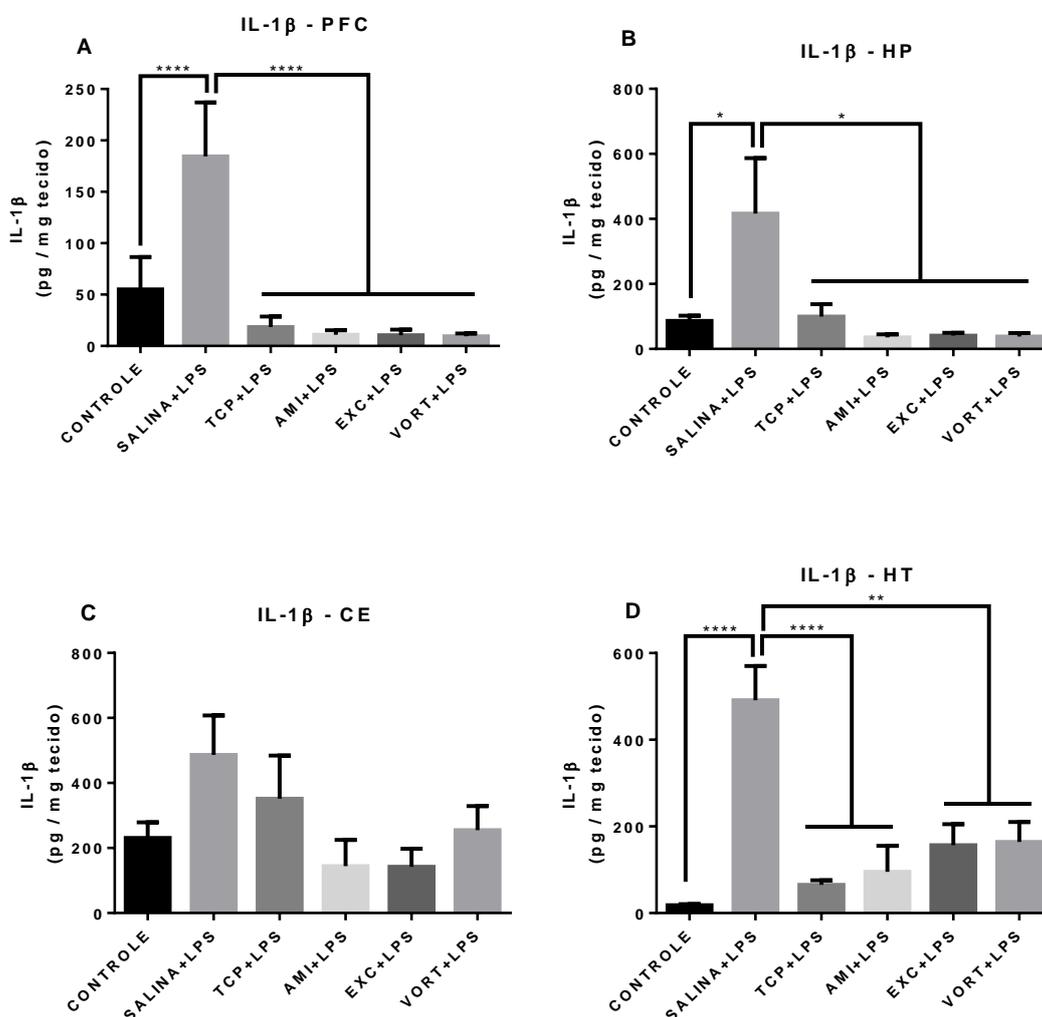


Figura 18 – Níveis de IL-1 β em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.7 Mediadores da Resposta Th1

7.7.1 Avaliação da ação das drogas antidepressivas sobre as concentrações de INF γ em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.

Nas áreas do córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e hipotálamo a administração de LPS aumentou significativamente os níveis de INF γ em comparação ao grupo controle (Figura 19A, 19B, 19C e 19D). A administração repetida de drogas antidepressivas foi capaz de prevenir o aumento de INF γ no córtex pré-frontal (Figura 19A) dos grupos TCP+LPS, AMI+LPS e VORT+LPS, em comparação com o grupo SALINA+LPS [F (5, 23) = 4.103, P=0,0083]. Ao analisarmos o Hipocampo (Figura 19B), verificamos que todos os grupos tratados com drogas antidepressivas foram capazes de prevenir o aumento de INF γ em comparação com o grupo SALINA+LPS [F (5, 24) = 5.674, P=0,0014]. No corpo-estriado os grupos TCP+LPS e VORT+LPS, demonstram que foram capazes de prevenir a elevação dos níveis basais de INF γ ocasionados pelo LPS (Figura 19C). Nesta mesma área houve diferença significativa entre os grupos TCP+LPS, ESC+LPS e VORT+LPS comparados com o grupo AMI+LPS, evidenciando um aumento do último em comparação aos demais citados [F (5, 24) = 11.79, P=0,0001]. Todos os grupos tratados com antidepressivos preveniram o aumento de INF γ , causado pela administração do LPS no hipotálamo (Figura 19D) [F (5, 24) = 17.63, P=0,0001].

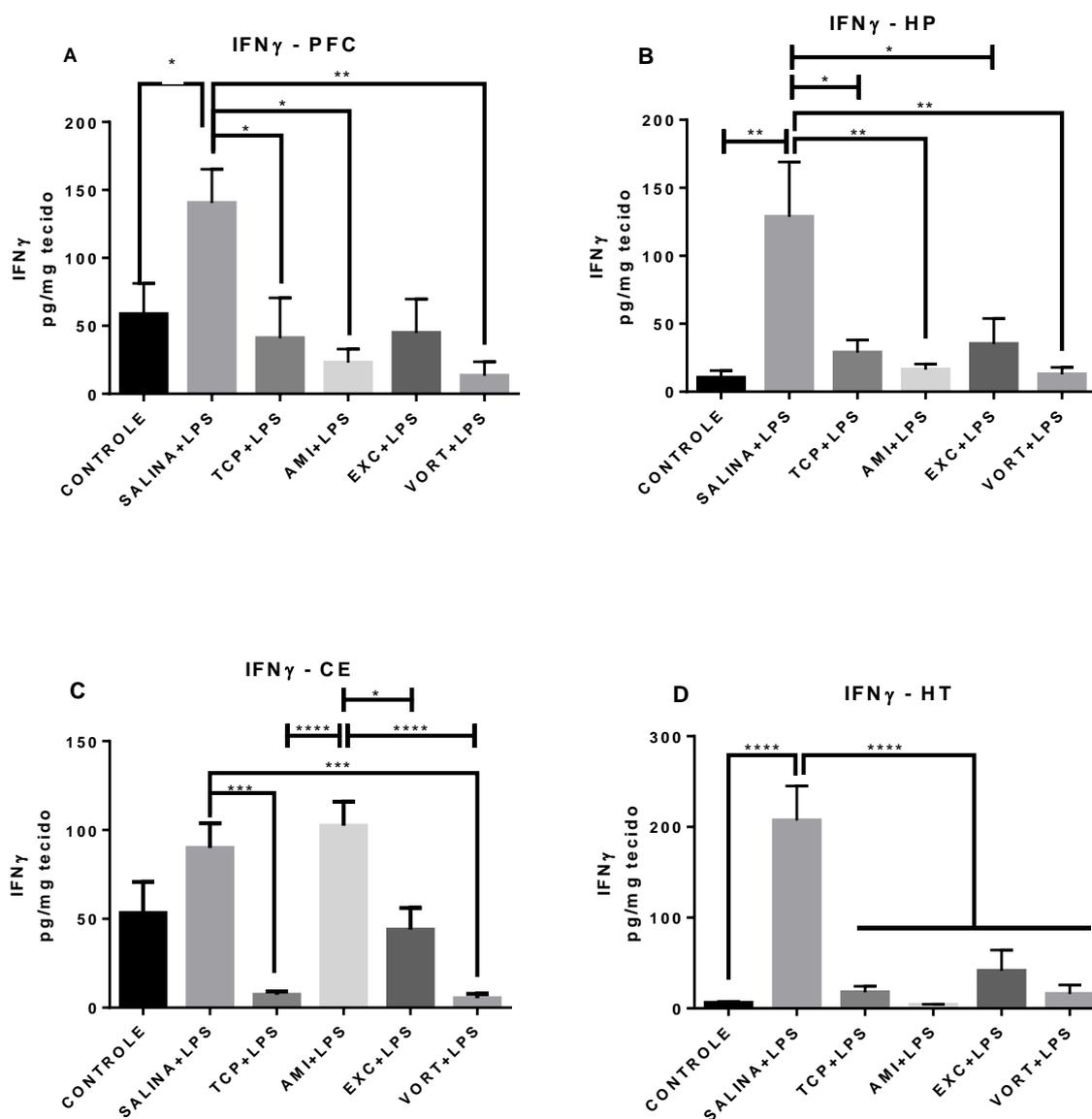


Figura 19 – Níveis de IFN γ em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.7.2 Avaliação da ação das drogas antidepressivas sobre as concentrações de TNF α em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.

No hipocampo e hipotálamo a administração de LPS aumentou significativamente os níveis de TNF α em comparação ao grupo controle (Figuras 20B e 20D). A administração repetida de drogas antidepressivas foi capaz de prevenir o aumento de TNF α no córtex pré-frontal (Figura 20A) do grupo VORT+LPS, em comparação com o grupo SALINA+LPS [F (5, 24) = 2.188, P=0,0891]. Ao analisarmos o Hipocampo, verificamos que os grupos AMI+LPS e VORT+LPS foram capazes de prevenir o aumento de TNF α (Figura 20B) em comparação com o grupo SALINA+LPS [F (5, 24) = 2.996, P=0,0306]. No corpo-estriado (Figura 20C) os grupos TCP+LPS e VORT+LPS, preveniram a elevação dos níveis basais de TNF α ocasionados pelo LPS [F (5, 24) = 0.8513, P=0,5274]. No hipotálamo, verificamos um aumento significativo do grupo SALINA+LPS em comparação ao grupo CONTROLE, observou-se que os grupos TCP+LPS e VORT+LPS, ocorreu a prevenção da elevação dos níveis de TNF α causada pelo LPS (Figura 20D) [F (5, 24) = 3.474, P=0,0167].

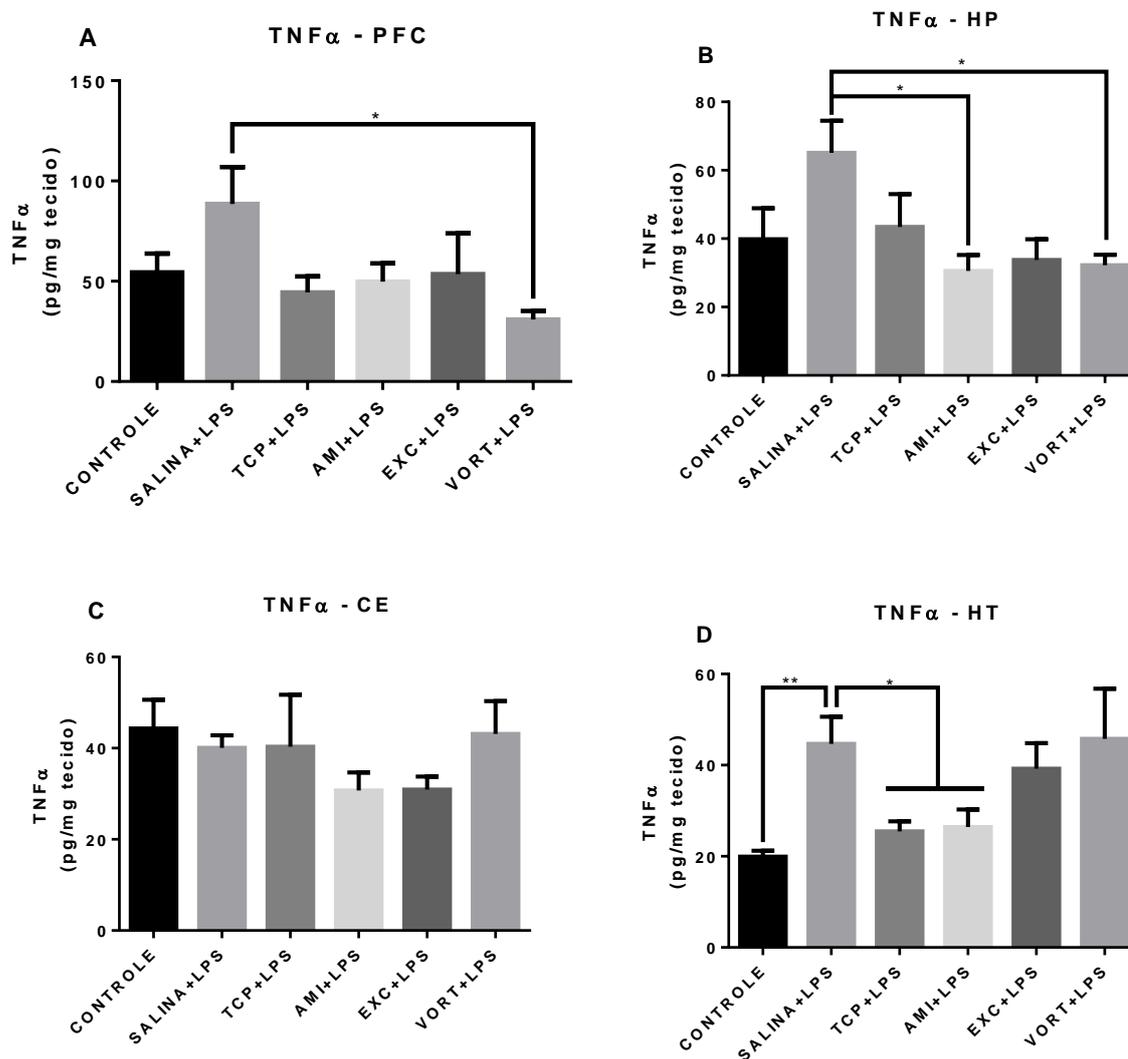


Figura 20 – Níveis de TNF α em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptylina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.8 Mediadores da Resposta Th2

7.8.1 Avaliação da ação das drogas antidepressivas sobre as concentrações de IL-4 em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.

As concentrações de IL-4 foram mais elevadas no grupo CONTROLE em comparação aos grupos TCP+LPS, AMI+LPS, ESC+LPS e VORT+LPS no córtex pré-frontal (Figura 21A). Na mesma área cerebral, observa-se diferença significativa do grupo SALINA+LPS em comparação aos grupos TCP+LPS e VORT+LPS [F (5, 24) = 7.265, P=0,0003]. A Figura 22B, apresenta a análise dos homogenatos do hipocampo, verificou-se que os grupos CONTROLE e SALINA+LPS, demonstraram níveis de IL-4 significativamente superior aos grupos AMI+LPS, ESC+LPS e VORT+LPS [F (5, 24) = 18.50, P=0,0001]. Os níveis de IL-4 do grupo VORT+LPS no hipotálamo (Figura 21A) foram superiores aos dos grupos CONTROLE, SALINA+LPS, TCP+LPS e ESC+LPS [F (5, 24) = 7.186, P=0,0003].

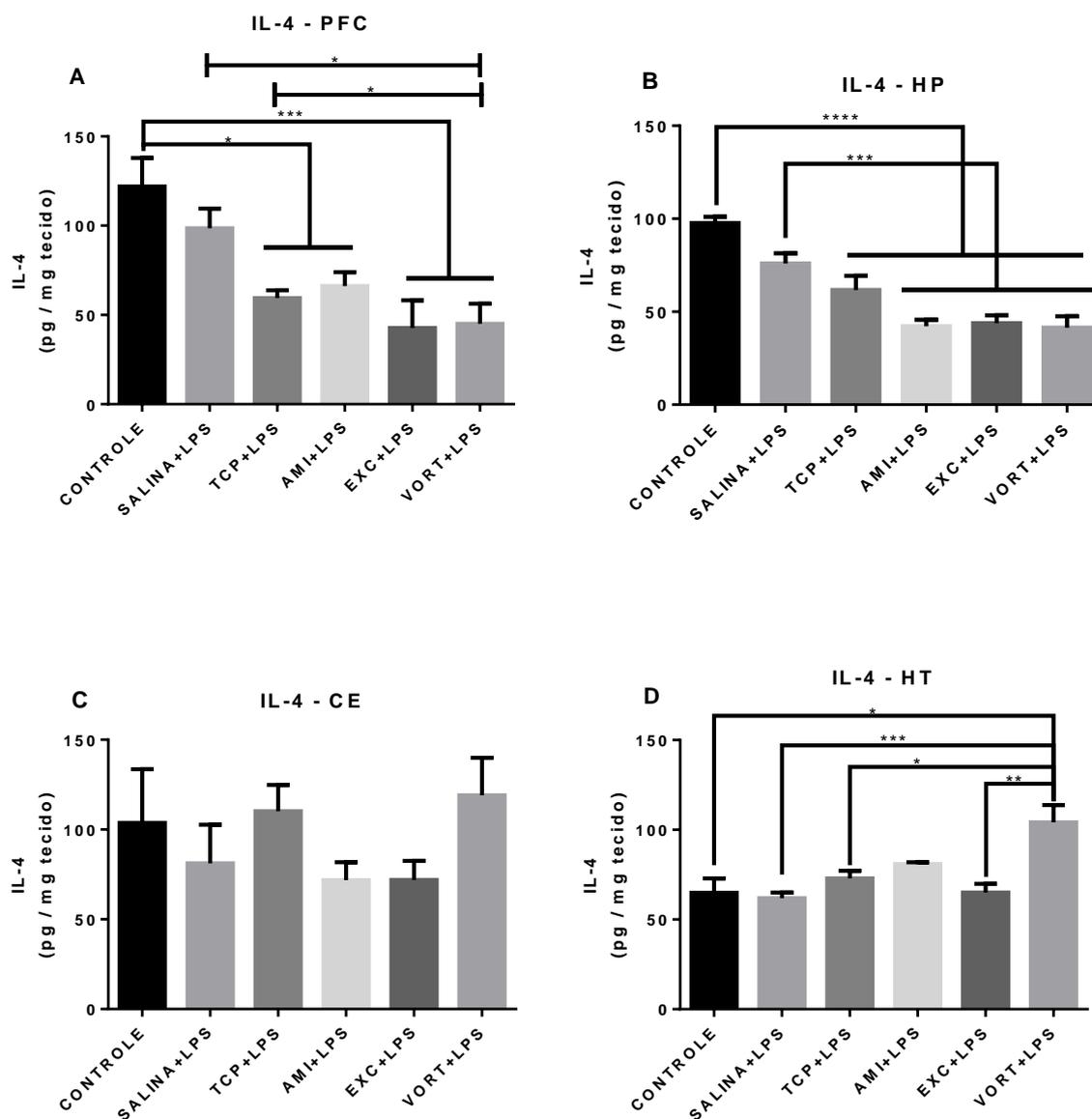


Figura 21 – Níveis de IL-4 em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. * $P < 0,001$.

7.8.2 Avaliação da ação das drogas antidepressivas sobre as concentrações de IL-6 em homogenatos cerebrais de ratos expostos ao LPS.

Ocorreu aumento dos níveis de IL-6 nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado dos animais do grupo SALINA+LPS em comparação ao grupo CONTROLE (Figuras 22A, 22B e 22C). No córtex pré-frontal e corpo estriado os grupos de animais tratados com antidepressivos foram capazes de prevenir o aumento dos níveis basais de IL-6 ocasionado pelo LPS (Figura 22A e 22C). Com relação ao hipocampo, os grupos TCP+LPS, AMI+LPS e VORT+LPS, preveniram a elevação dos níveis desta citocina em decorrência da administração do LPS (Figura 22B).

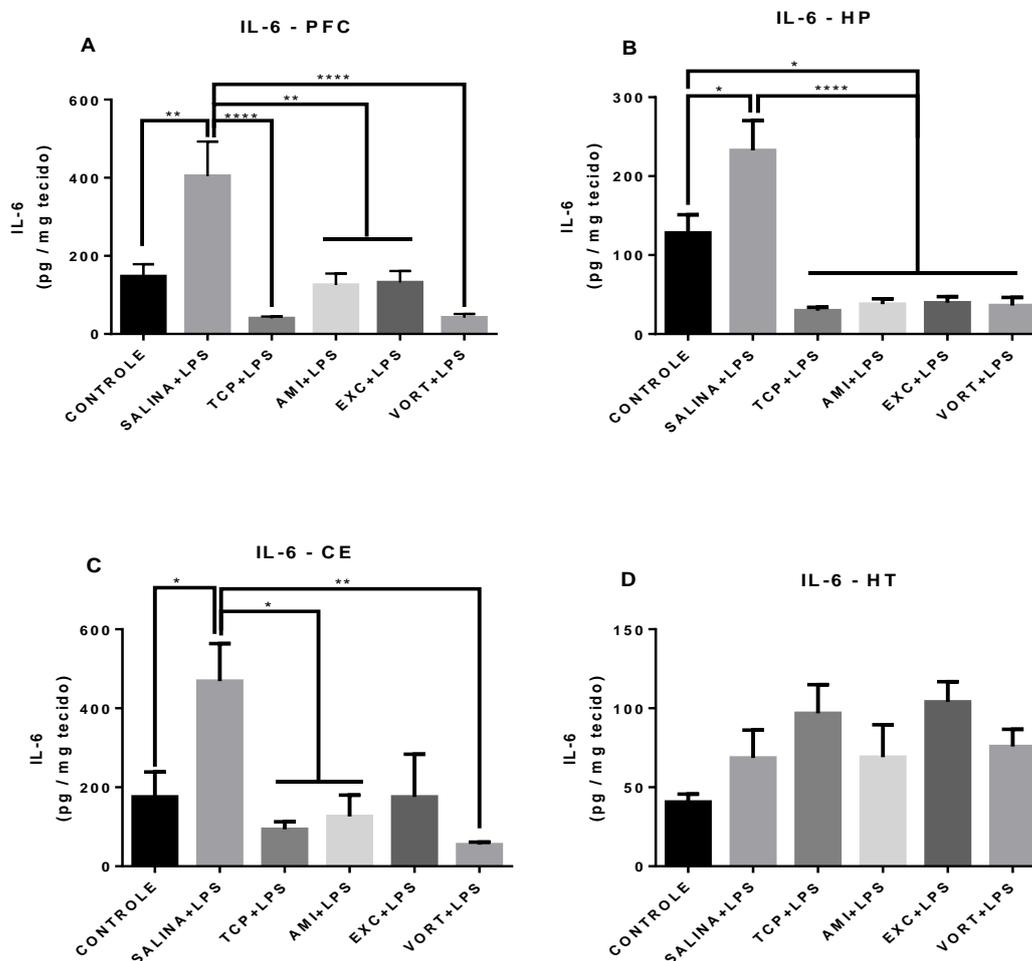


Figura 22– Níveis de IL-6 em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos tratados com Salina, Tranilcipromina, Amitriptilina, Escitalopran e Vortioxetina por dez dias e administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p no décimo dia de tratamento e observados 24 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. * $P < 0,001$.

PROTOCOLO 2

7.9 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS no nado forçado em ratos desafiados com LPS.

Utilizado para avaliar o comportamento depressão-símile em roedores, o Teste do Nado Forçado (FST), verificou o tempo de imobilidade do animal, avaliando assim um fenótipo da doença. De acordo com o teste de ANOVA de uma via [$F(4, 31) = 11.55, P = 0,0001$], verificou-se que houve aumento significativo de imobilidade do grupo com LPS+SALINA comparado com os grupos CONTROLE, LPS+L-NAME, LPS+7-NI e LPS+1400W (Figura 23).

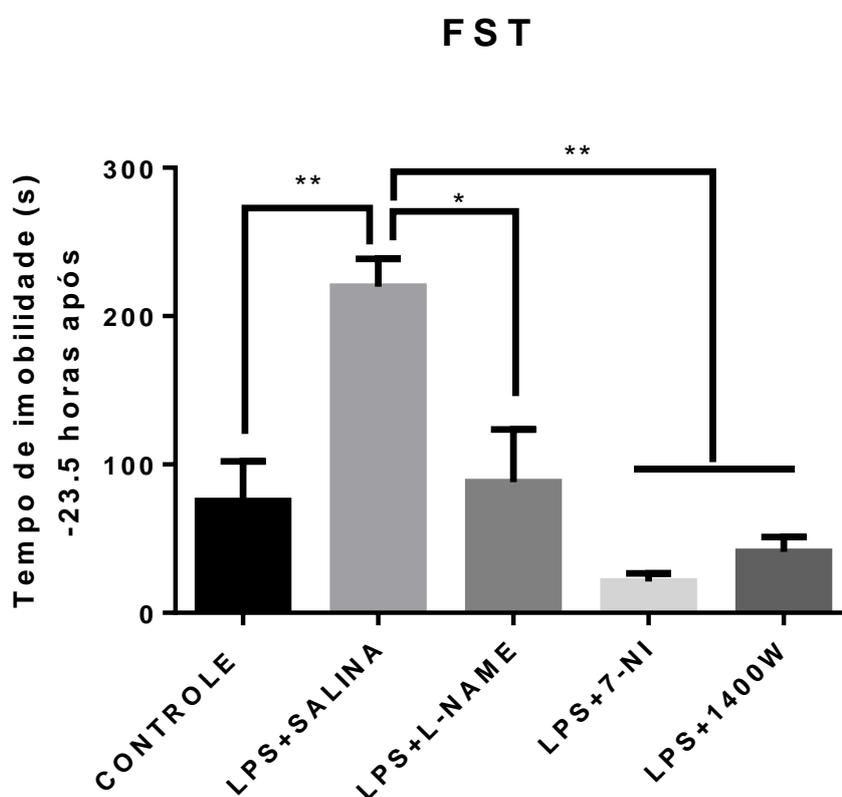


Figura 23 - Tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. * $P < 0,001$.

7.10 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre a preferência por sacarose em ratos expostos ao LPS.

No teste de Preferência por Sacarose houve uma redução do consumo de sacarose do LPS+SALINA ao compararmos com o CONTROLE [F (4, 27) = 3.067, P= 0,0332]. Neste teste foi verificado um aumento significativo pela preferência por sacarose, do grupo LPS+7-NI comparado com o mesmo grupo LPS+SALINA (Figura 24).

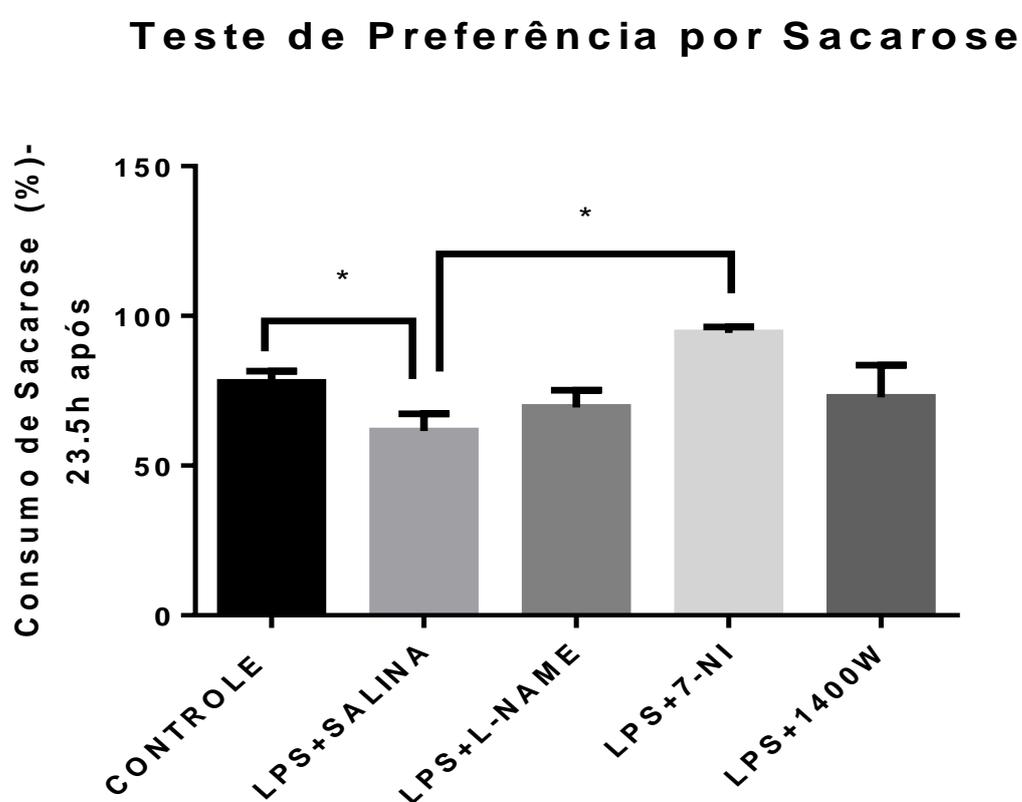


Figura 24 – Teste da Preferência por Sacarose em ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.11 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS no campo aberto em ratos expostos ao LPS.

Esse teste foi desenvolvido, sugerindo que a atividade motora do animal no campo aberto como indicadora de seu estado emocional. A baixa atividade locomotora indica a ansiedade do animal. As Figuras 25A, 25B, 25C, 25D e 25E, mostram os parâmetros número de quadrantes percorridos, distância total percorrida, total de entradas no centro, tempo no centro e distância no centro, respectivamente.

A figura 25A traz uma relação significativa entre o grupo CONTROLE e os grupos LPS+SALINA e LPS+L-NAME, bem como do grupo LPS+SALINA com os grupos LPS+7-NI e LPS+1400W [$F(4, 28) = 7.343, P = 0,0004$]. No teste de comparações múltiplas é possível observar ainda significativa entre o grupo LPS+SALINA e LPS+7-NI ($p < 0,05$). O grupo CONTROLE, apresentou uma distância total significativamente superior (Figura 25B) aos grupos LPS+SALINA, LPS+L-NAME e LPS+7-NI [$F(4, 27) = 5.931, P = 0,0015$].

A partir da figura 25C é possível notar uma relação significativa entre o grupo CONTROLE e o grupo LPS+SALINA e não foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos no teste de comparações múltiplas. Observou-se uma redução significativa do Tempo no Centro (Figura 25D) dos grupos LPS+SALINA e LPS+L-NAME em comparação ao grupo CONTROLE. A avaliação da Distância no Centro, pode ser visualizada na Figura 25E, nota-se que a distância percorrida no centro foi superior do grupo CONTROLE, sendo estatisticamente significativa com relação aos grupos LPS+SALINA e LPS+L-NAME.

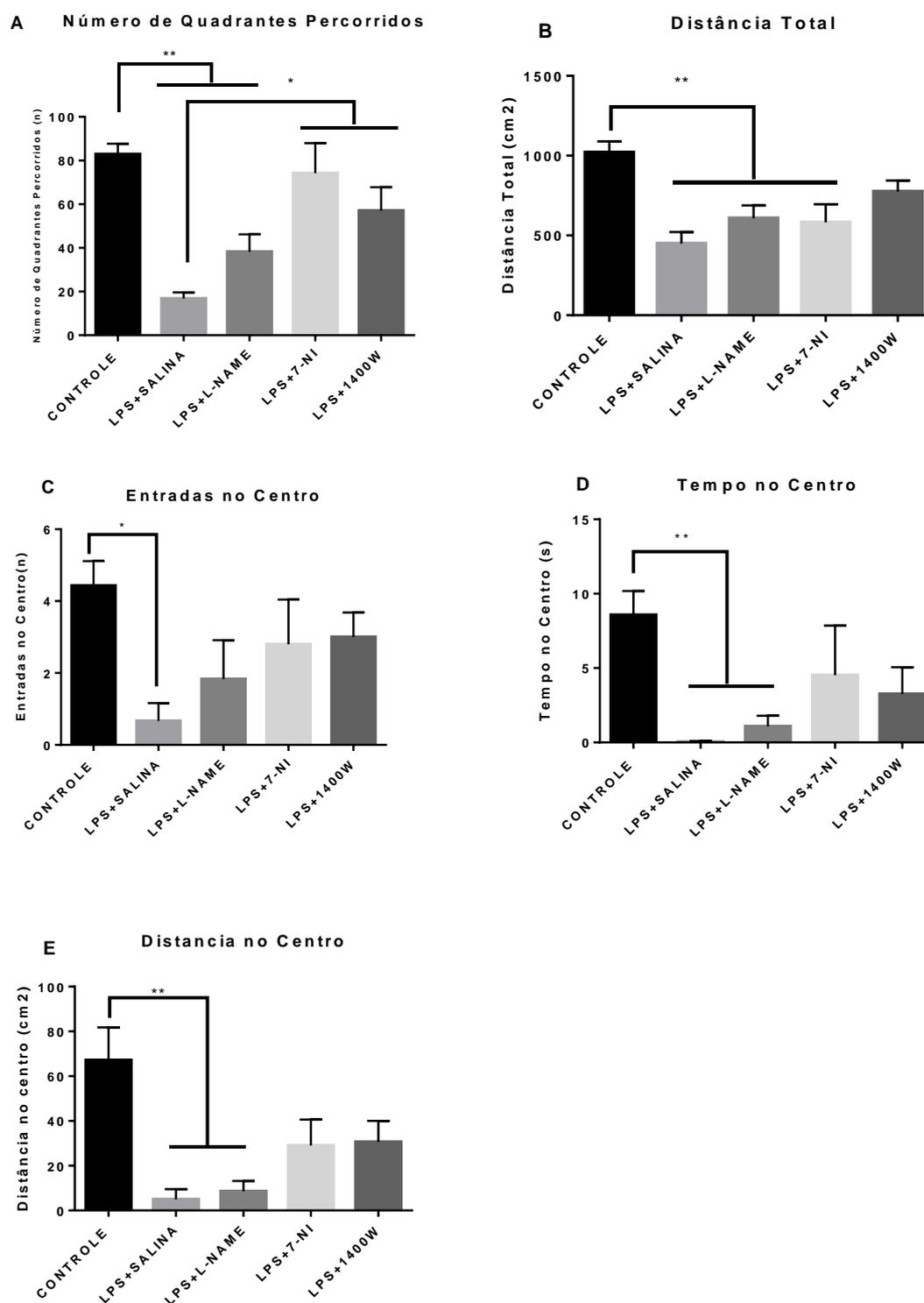


Figura 25 – Teste do Campo Aberto ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de uma via, seguida por Tukey post test. * $P < 0,001$.

7.12 Mediadores da Resposta Imune Inata

7.12.1 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre a atividade da mieloperoxidase em áreas cerebrais de ratos desafiados com LPS.

Foi verificada uma redução na atividade da MPO na área do Hipocampo (Figura 26B), dos grupos LPS+L-NAME e LPS+1400W com relação ao grupo CONTROLE e LPS+SALINA [F (4, 24) = 8.044, P= 0,0003].

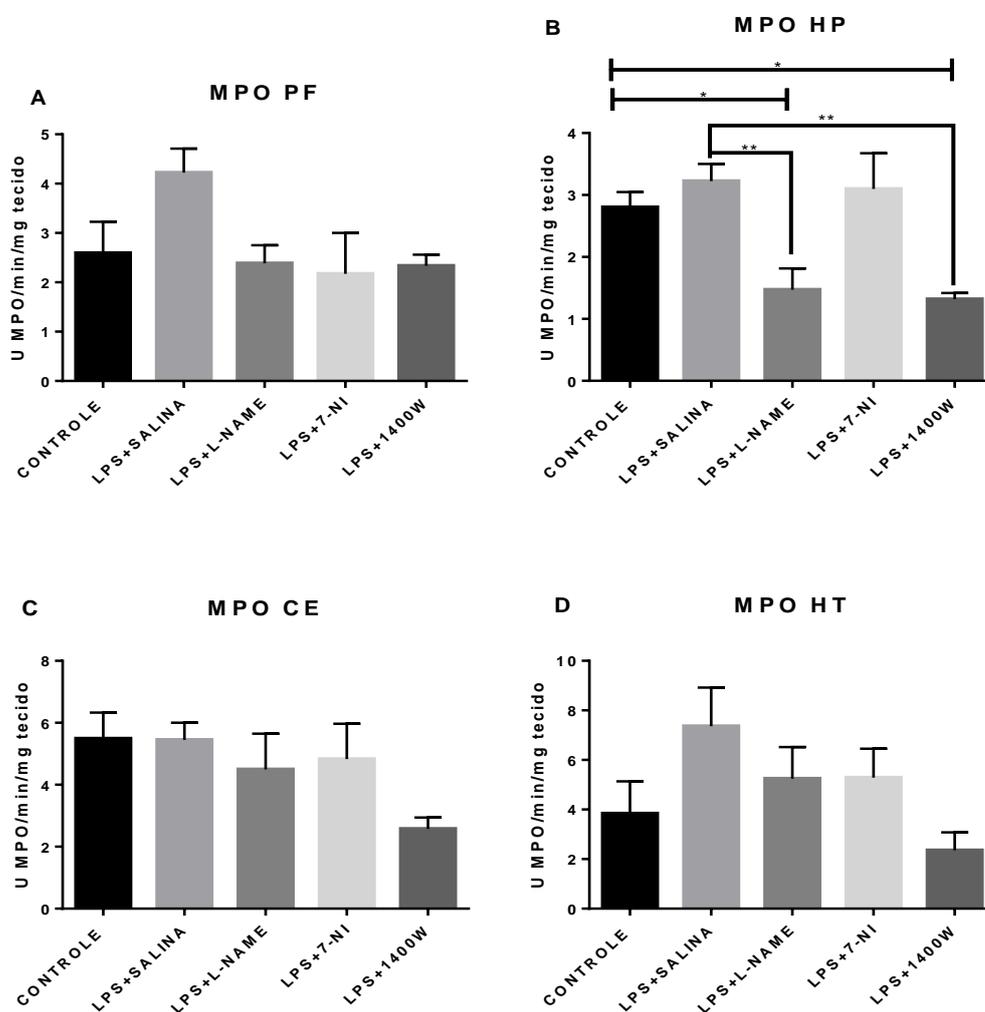


Figura 26 – Avaliação da Atividade da MPO em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.13 Mediadores da Resposta Th1

7.13.1 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre as concentrações de $\text{INF}\gamma$ em áreas cerebrais de ratos expostos ao LPS.

No Córtex pré-frontal, o grupo LPS+SALINA, elevou os níveis de $\text{INF}\gamma$, fato evidenciado pelo seu aumento significativo com relação ao grupo CONTROLE, nessa mesma área cerebral o grupo tratado com L-NAME, foi capaz de reverter o aumento dos níveis de $\text{INF}\gamma$ ocasionado pelo LPS (Figuras 27A) [F (4, 24) = 4.873, P= 0,0057]. Já no Corpo estriado, houve aumento dos níveis basais de $\text{INF}\gamma$ do grupo LPS+SALINA em comparação ao grupo CONTROLE. Ainda no corpo estriado o 7-NI e 1400W, reverteram os efeitos do LPS sobre o $\text{INF}\gamma$ (Figura 27C) [F (4, 24) = 3.888, P=0,0142].

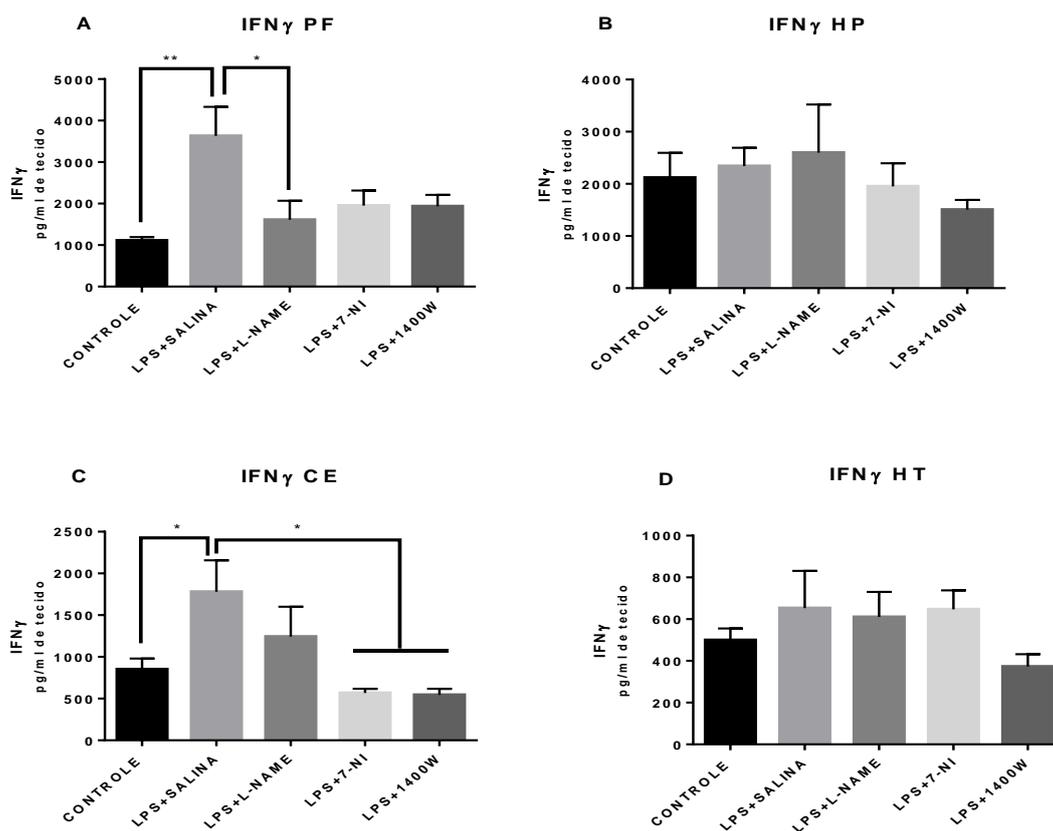


Figura 27 – Avaliação das concentrações de $\text{INF}\gamma$ áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.13.2 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre as concentrações de TNF α em áreas cerebrais de ratos expostos ao LPS.

No Córtex pré-frontal o grupo tratado com L-NAME, foi capaz de reverter o aumento dos níveis de TNF α ocasionado pelo LPS (Figuras 28A) [F (4, 23) = 4.822, P= 0,0,0057]. O 7-NI, reverteu os efeitos do LPS sobre o TNF α (Figura 28D) no hipotálamo [F (4, 24) = 3.888, P=0,0142].

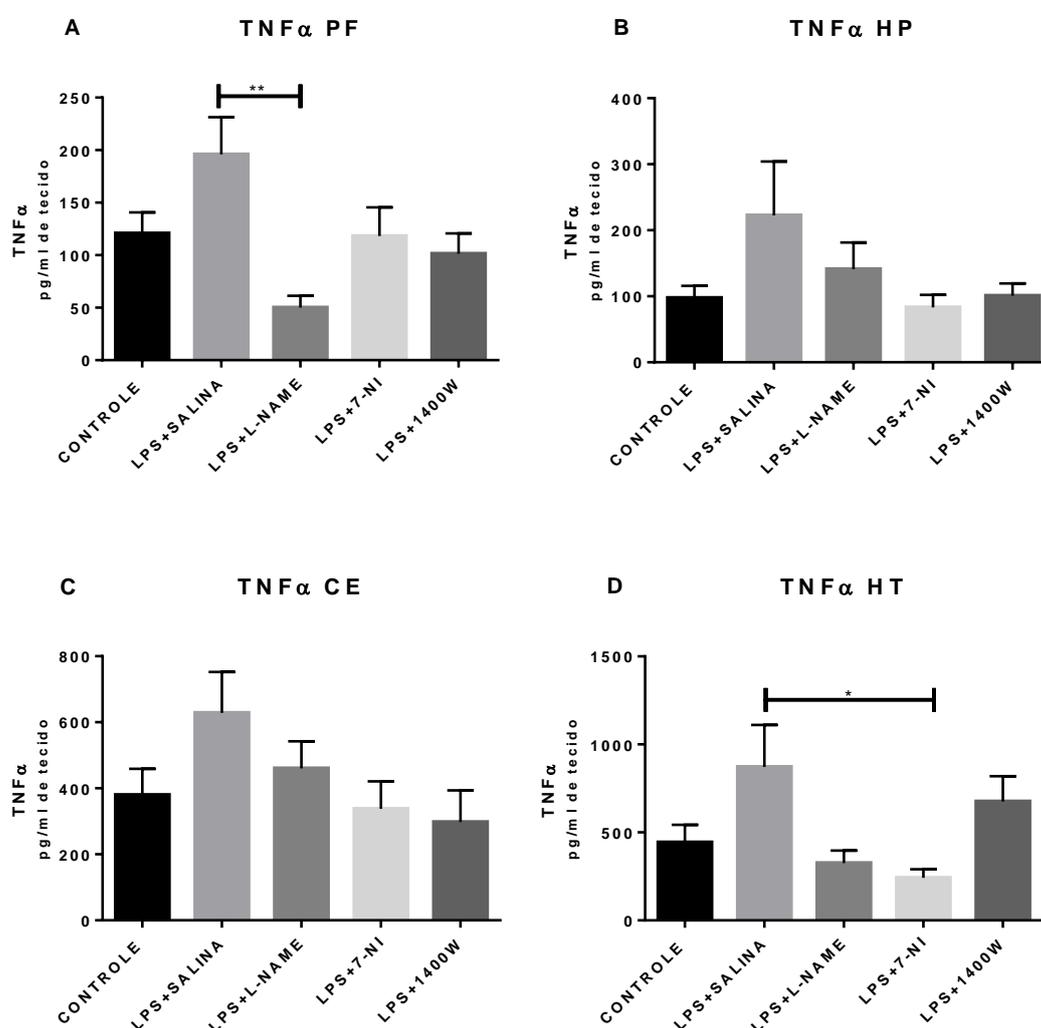


Figura 28 – Avaliação das concentrações de TNF- α áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.14 Mediadores da Resposta Th2

7.14.1 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre as concentrações de IL-4 em áreas cerebrais de ratos expostos ao LPS.

As concentrações de IL-4 foram mais elevadas no grupo LPS+1400W em comparação aos grupos CONTROLE, LPS+SALINA e LPS+L-NAME no corpo estriado (Figura 29C) [F (4, 25) = 9.068, P=0,0001]. Os níveis de IL-4 do grupo LPS+1400W no hipotálamo (Figura 29D) foram superiores aos dos grupos CONTROLE, LPS+ SALINA e LPS+L-NAME. Ainda na Figura 30D verifica-se que os níveis de IL-4 do grupo LPS+7-NI são superiores aos do grupo LPS+SALINA [F (4, 23) = 7.170, P = 0,0007].

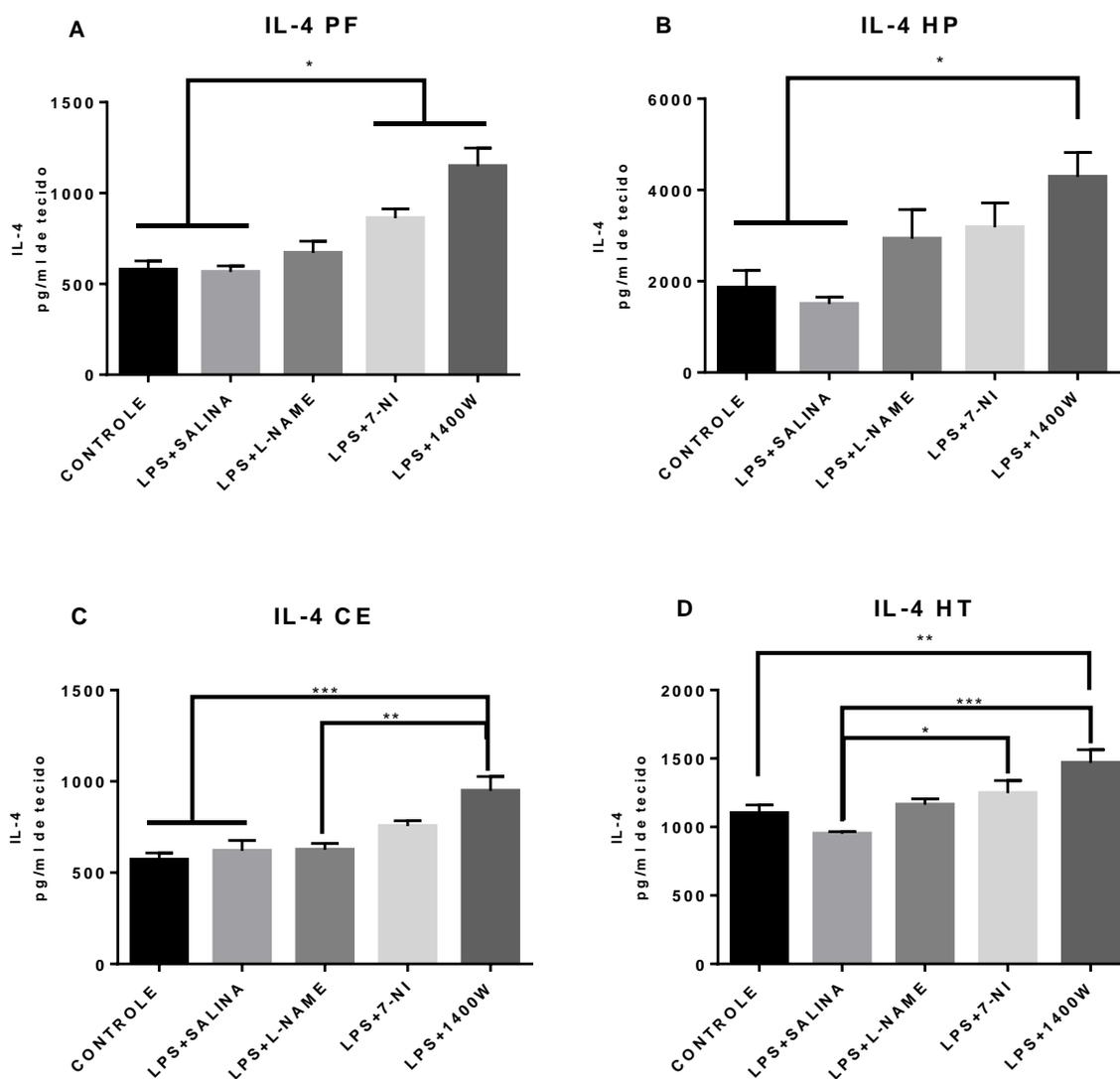


Figura 29 – Avaliação das concentrações de IL-4 áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey post test. *P < 0,001.

7.14.2 Avaliação da inibição central de isoformas da NOS sobre as concentrações de IL-6 em áreas cerebrais de ratos expostos ao LPS.

Ocorreu aumento dos níveis de IL-6 nas áreas cerebrais hipocampo e hipotálamo dos animais do grupo LPS+SALINA em comparação ao grupo CONTROLE (Figuras 30B e 30C). No hipocampo (Figura 30B) os grupos de animais tratados LPS, aumentaram os níveis basais dessa citocina, em comparação ao grupo CONTROLE [F (4, 23) = 11.80, P < 0,0001]. Com relação ao corpo estriado (figura 30C), os grupos LPS+7-NI e LPS+1400W, reverteram o aumento dos níveis de IL-6 em decorrência da administração do LPS [F (4, 25) = 3.884, P = 0,0138]. A figura 30D evidencia a dosagem de IL-6 no hipotálamo, observa-se que todas as drogas foram capazes de reverter o efeito do LPS [F (4, 26) = 5.067, P = 0,0037].

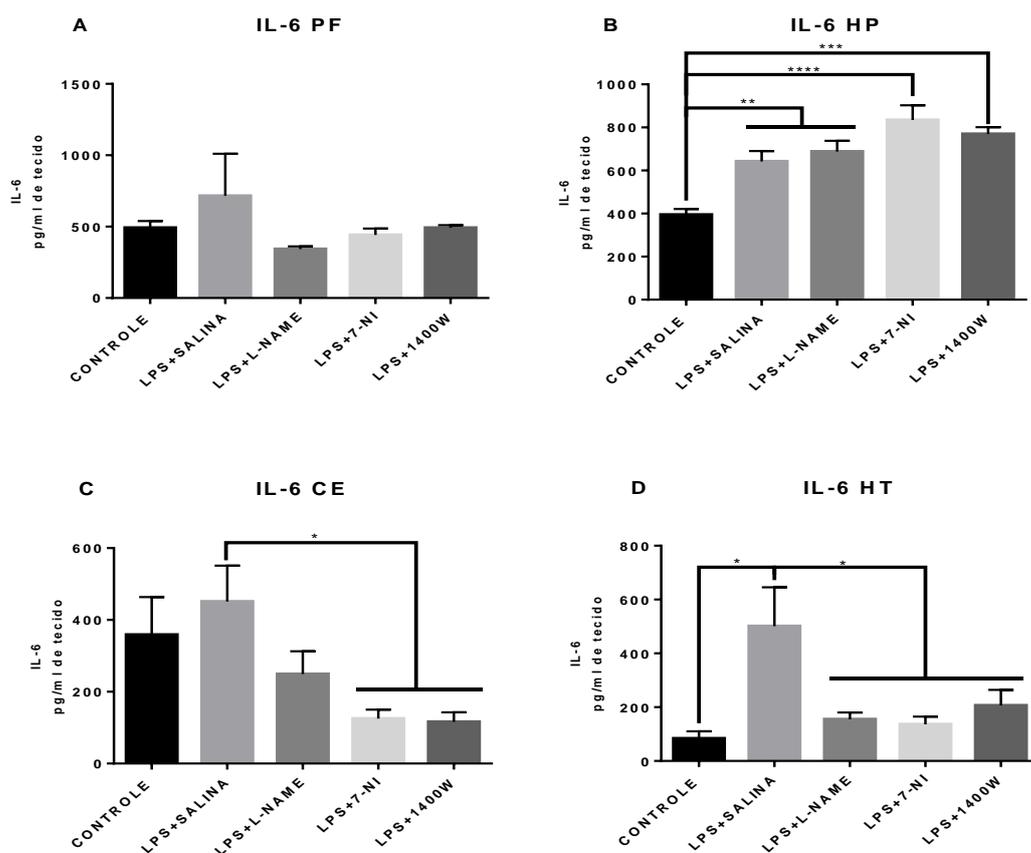


Figura 30 – Avaliação das concentrações de IL-6 áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo) de ratos machos, submetidos a cirurgia estereotáxica, após 72hs tratados com administração única de LPS 0,83 mg/kg, i.p e L-NAME, 7-Nitridazole e 1400W i.c.v. e observados 23.5 h após administração do LPS. As barras representam média \pm EPM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey post test. * $P < 0,001$.

7.15 Resumo dos resultados

Quadro 04: Representação esquemática dos efeitos de TCP, AMI, ESC e VORT, sobre os testes comportamentais

TESTE	CONTROLE	SALINA + LPS	TCP + LPS	AMI + LPS	ESC + LPS	VORT + LPS
IMOBILIDADE NO FST	 *	 #	 *	 *	 *	 *
SPLHASH - tempo de latência de grooming						
SPLASH - tempo de grooming						 #
Campo Aberto Nº de Cruzamentos	 t  a	 t  a	 * # a v e	 * # t	 t	 t

Fonte: Próprio autor. Grupos comparados com o Controle (#), LPS (*), TCP (t), AMI (a), EXC (e) e VORT (v). Déficit ou diminuição (); melhora ou aumento (); ausência de efeitos estatisticamente significantes ().

Quadro 05: Representação esquemática dos efeitos de TCP, AMI, ESC e VORT sobre os testes Neuroquímicos.

TESTE	CONTROL	SALINA + LPS	TCP + LPS	AMI + LPS	ESC + LPS	VORT + LPS
IL-1 β no soro	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Nitrito – PF	↓ e v	↓ v	↔	↓ e v	↑ # a	↑ # *a
Nitrito – HP	↓ v	↓ v	↓ v	↔	↔	↑ # * t
Nitrito – CE	↓ a	↓ a	↔	↑ # *	↔	↔
Nitrito – HT	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
IL-1 β – PF	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
IL-1 β – HP	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
IL-1 β – CE	↔	↔	↔	↔	↔	↔
IL-1 β – HT	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
INF γ – PF	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
INF γ – HP	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
INF γ – CE	↔	↑ t v	↓ * a	↑ t v e	↓ a	↓ * a
INF γ – HT	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *
TNF α – PF	↔	↑ v	↔	↔	↔	↓ *
TNF α – HP	↔	↑ a v	↔	↓ *	↔	↓ *
TNF α – CE	↔	↔	↔	↔	↔	↔
TNF α – HT	↓ *	↑ # t a	↓ *	↓ *	↔	↔
IL-4 – PF	↑ t a e v	↑ v	↓ # ↑ t	↓ *	↓ *	↓ # *
IL-4 – HP	↑ t a e v	↑ a e v	↓ #	↓ # *	↓ # *	↓ # *
IL-4 – CE	↔	↔	↔	↔	↔	↔
IL-4 – HT	↓ v	↓ v	↓ v	↔	↓ v	↑ # * t e
IL-6 – PF	↓ *	↑ # t a v e	↓ *	↓ *	↓ *	↓ *

IL-6 – HP	 *  t a v e	 # t a v e	 # *	 # *	 # *	 # *
IL-6 – CE	 *	 # t a v e	 *	 *	 *	 *
IL-6 – HT						

Fonte: Próprio autor. Grupos comparados com o Controle (#), LPS (*), TCP (t), AMI (a), ESC (e) e VORT (v). Déficit ou diminuição (); melhora ou aumento (); ausência de efeitos estatisticamente significantes ().

Quadro 6 – Representação esquemática dos efeitos de LPS, L-NAME, 7-NI e 1400W sobre os testes comportamentais (Protocolo 2)

TESTE	CONTROLE	LPS + SALINA	LPS + L-NAME	LPS + 7-NI	LPS + 1400W
IMOBILIDADE NO FST	 *	 # 123	 *	 *	 *
Teste de Preferência por Sacarose	 *	 2		 *	
Campo Aberto – Número de Quadrantes percorridos	 * 1	 #	 #	 *	
Campo Aberto – Distância total percorrida	 * 1	 #	 #		
Campo Aberto – Entradas no Centro	 * 1	 #			
Campo Aberto – Tempo no Centro	 1		 #		
Campo Aberto – Número de Quadrantes percorridos	 * 1	 #	 #		

Fonte: Próprio autor. Grupos comparados com o Controle (#), LPS (*), L-NAME (1), 7-NI (2) ou 1400W (3). Déficit ou diminuição (); melhora ou aumento (); ausência de efeitos estatisticamente significantes ().

Quadro 7 – Representação esquemática dos efeitos de LPS, L-NAME, 7-NI e 1400W sobre os testes neuroquímicos (Protocolo 2)

TESTE	CONTROLE	LPS + SALINA	LPS + L-NAME	LPS + 7-NI	LPS + 1400W
MPO – PF	↔	↔	↔	↔	↔
MPO – HP	↑ 1 3	↑ 1 3	↓ * #	↔	↓ * #
MPO – CE	↔	↔	↔	↔	↔
MPO – HT	↔	↔	↔	↔	↔
INF γ – PF	↓ *	↑ #1	↓ *	↔	↔
INF γ – HP	↔	↔	↔	↔	↔
INF γ – CE	↓ *	↑ #2 3	↔	↓ *	↓ *
INF γ – HT	↔	↔	↔	↔	↔
TNF α – PF	↔	↑ 1	↓ *	↔	↔
TNF α – HP	↔	↔	↔	↔	↔
TNF α – CE	↔	↔	↔	↔	↔
TNF α – HT	↔	↑ 2	↔	↓ *	↔
IL-4 – PF	↔	↔	↔	↔	↔
IL-4 – HP	↔	↔	↔	↔	↔
IL-4 – CE	↓ 3	↓ 3	↓ 3	↔	↑ # * 1
IL-4 – HT	↓ 3	↓ 2 3	↓ 3	↑ *	↑ # * 1
IL-6 – PF	↔	↔	↔	↔	↔
IL-6 – HP	↓ * 123	↑ #	↑ #	↑ #	↑ #
IL-6 – CE	↔	↑ 2 3	↔	↓ *	↓ *
IL-6 – HT	↓ *	↑ # 123	↓ *	↓ *	↓ *

Fonte: Próprio autor. Grupos comparados com o Controle (#), LPS (*), L-NAME (1), 7-NI (2) ou 1400W (3). Déficit ou diminuição (↓); melhora ou aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (↔).

8 DISCUSSÃO

8.1 Efeito imunomodulador de diferentes classes de antidepressivos

No presente estudo, todos os antidepressivos testados preveniram eficientemente o comportamento semelhante a depressão induzida por LPS, mas apenas o VORT foi eficaz, prevenindo o comprometimento do comportamento motivado / autocuidado. Em relação às alterações neuroimunes / inflamatórias, todos os antidepressivos apresentaram efeitos supressores sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias no cérebro. A VORT demonstrou uma capacidade única de aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-4 no estriado e no hipotálamo de ratos.

A relação entre depressão e imunidade já está bem descrita na literatura. A administração de imunógenos (produtos bacterianos, citocinas) em humanos saudáveis pode induzir uma resposta comportamental complexa que se assemelha à depressão clínica (EISENBERGER et al., 2010; SUAREZ et al., 2004; VOGELZANGS et al., 2016). Em roedores, os modelos baseados em LPS induzem um espectro dependente do tempo de alterações comportamentais, ou seja, comportamento de doença (fase aguda) e, subsequentemente, comportamento depressivo (24 h após LPS) (GRIGOLEIT et al., 2011; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). Essa distinção veio da observação de que agudamente (1,5-2h) após o desafio do LPS, as alterações comportamentais predominantes são letargia, anorexia e inibição locomotora (um comportamento típico de doença), enquanto 24 horas depois, ocorre o surgimento de comportamento depressivo, incluindo anedonia, comportamentos semelhantes ao desespero e relacionados à ansiedade (CUSTÓDIO et al., 2013). Nesse momento, a pirexia, assim como o comprometimento motor e a anorexia, retornam aos níveis basais. No presente estudo, como esperado, emergiram 24 horas após o desafio sistêmico com o LPS, como o aumento da imobilidade (comportamento de desespero), a redução no consumo de sacarose (anedonia) e o comportamento de higiene (comportamento motivado / autocuidado) sem alterações na atividade locomotora (DANTZER et al., 2008; FRENOIS et al., 2007).

Outro ponto interessante que ajuda os pesquisadores a diferenciarem o espectro de alterações comportamentais do comportamento de doença e do comportamento depressivo é a relação entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma e no cérebro após o desafio com LPS (CUSTÓDIO et al., 2013; DANTZER et al., 2008; MELLO et al., 2018). Nosso grupo

de pesquisa demonstrou anteriormente que, 1,5 horas após a injeção sistêmica de LPS, ocorre um pico de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF α) no plasma e cérebro de camundongos. No entanto, 24 horas depois, o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias permaneceu apenas nas áreas do cérebro, mas não na circulação (CUSTÓDIO et al., 2013). Aqui, no ponto de tempo avaliado, 24 horas após a administração de LPS, os níveis de IL-1 no plasma, em todos os grupos tratados com LPS com ou sem antidepressivos foram semelhantes aos níveis de grupo controle. Este resultado, associado a ausência de hipolocomoção nos animais estudados, confirma que as alterações observadas após o LPS são compatíveis com o comportamento depressivo e não com o comportamento de doença.

Desde a proposta original de LPS desafio como um modelo de roedores de depressão por Yirmiya em 1995, a capacidade de tratamento crônico, mas não agudo com TCAs, como a imipramina para prevenir mudanças comportamentais foi demonstrada (YIRMIYA, 1996). Shen et al., 1999 relataram que o tratamento crônico (21 dias) com a desipramina, um outro representante da classe dos TCAs, mas não com a paroxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) ou com a venlafaxina inibidor de recaptação de serotonina-norepinefrina (ISRSN), reverteu mudanças comportamentais induzidas por LPS (apetite, consumo de água e comportamento noturno) 2 horas após o desafio. No entanto, nenhum dos antidepressivos testados reverteu as mudanças no consumo de sacarose (SHEN et al., 1999). Outros estudos corroboram com a evidência de que os antidepressivos aliviam as mudanças comportamentais induzidas pelo LPS em um momento compatível com o comportamento depressivo (FERREIRA MELLO et al., 2013; TOMAZ et al., 2014). Em relação aos ISRS, enquanto alguns estudos demonstraram a incapacidade desses agentes, principalmente a fluoxetina, para reverter o comportamento depressivo tipo LPS (DUDA et al., 2017), outros relataram que a paroxetina preveniu eficientemente o comportamento semelhante ao desespero induzido por LPS (OHGI et al., 2013). Mais recentemente, Dong et al., 2016 também mostraram que o S-citalopram, um ISRS, reverteu acentuadamente os aumentos de imobilidade induzidos por LPS em testes de natação forçada e suspensão em cauda (DONG et al., 2016).

Demonstramos que o tratamento com antidepressivos de diferentes classes e mecanismos, AMI, ESC, TCP e VORT, reduziram similarmente o aumento do comportamento de desespero induzido pelo LPS. No entanto, apenas o agente multimodal VORT preveniu o déficit motivacional (comportamento de autocuidado) induzido por LPS. Nenhum dos antidepressivos alterou as mudanças no consumo de sacarose induzidas pelo LPS. De acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira evidência do efeito antidepressivo do VORT, bem como do IMAO, TCP no modelo inflamatório da depressão. Além disso, até agora, nenhum

estudo anterior comparou a resposta de diferentes classes de antidepressivos no mesmo protocolo de pesquisa de depressão induzida por inflamação. Em conjunto, nossos resultados sugerem que todos os antidepressivos testados previnem, pelo menos parcialmente, o comportamento do tipo depressivo induzido por LPS.

Um crescente corpo de evidências tem mostrado efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores dos antidepressivos atuais (MAES, 2011b). No cenário clínico, vários estudos têm descrito a capacidade dos antidepressivos em modular as citocinas séricas e proteínas de fase aguda de pacientes deprimidos, geralmente diminuindo os mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (CAPURON et al., 2001; WRIGHT et al., 2005). Os antidepressivos também foram capazes de inibir a liberação de mediadores pró-inflamatórios de células imunes isoladas de pacientes e controles, bem como inibir vias de sinalização relacionadas à inflamação, como a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (DURAIRAJ; STEURY; PARAMESWARAN, 2015; NAZIMEK et al., 2017). Um estudo elegante demonstrou comparativamente a ação anti-inflamatória superior dos ISRSs (fluoxetina, paroxetina e sertralina) no bloqueio *in vitro* da produção microglial de TNF- α e óxido nítrico (NO) após estímulos com LPS (TYNAN et al., 2012). Por outro lado, a fenelzina, um outro IMAO acentuou a produção de citocinas pró-inflamatórias e de NO na microglia estimulada por LPS (CHUNG; KIM; BAE, 2012).

De acordo com estudos anteriores (CUSTÓDIO et al., 2013; FERREIRA MELLO et al., 2013; TOMAZ et al., 2014), observamos que o desafio LPS induziu um aumento acentuado nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF α , IFN γ e IL-6) em áreas do cérebro que regulam o humor. O tratamento com antidepressivos mostrou um efeito anti-inflamatório global contra a ativação imune induzida por LPS. No entanto, algumas diferenças entre os ADs se tornaram evidentes. A AMI não preveniu as alterações nos níveis de TNF α no CPF e IFN- γ no CE, mas foi altamente eficaz na redução de IL-1 β em todas as áreas testadas. O ESC não foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de TNF- α no PFC e HT, e de IFN- γ no CE. A TCP mostrou incapacidade de prevenir o aumento dos níveis de IL-1 β induzido por LPS apenas no CE, e a VORT não pôde prevenir as alterações de LPS nos níveis de IL-1 β e TNF- α , respectivamente no CE e HT. Nenhum dos antidepressivos testados alterou os níveis de TNF- α no CE, enquanto que apenas o VORT foi capaz de aumentar os níveis de IL-4 no CE e HT.

É bem conhecido que o tratamento com ADs, incluindo TCAs, ISRS, ISRSN pode proteger contra danos cerebrais associados à reatividade da microglia, produção de citocinas e superativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por estresse crônico (BOULLE et al., 2014; BROOKS et al., 2017; LU et al., 2017). No modelo inflamatório de depressão por

LPS, esta evidência é mais limitada. Alguns estudos relataram a capacidade dos ADTs de reduzir os níveis de IL-1 β e TNF- α no CPF, HC e CE de camundongos (CORDEIRO et al., 2019; FERREIRA MELLO et al., 2013) e incapacidade dos ISRS, fluoxetina, para neutralizar a ativação da microglia e a produção de citocinas pró-inflamatórias neste modelo (HEMMATI et al., 2019). Há também algumas evidências sobre o efeito anti-inflamatório da agomelatina no hipocampo de camundongos desafiados com LPS (ROSSETTI et al., 2018). Por outro lado, existe uma lacuna enorme em relação ao efeito de outras classes de antidepressivos, como os IMAO e os novos agentes multialvo (por exemplo, VORT), na resposta pró-inflamatória cerebral induzida pelo desafio com LPS. Assim, demonstramos pela primeira vez o potencial efeito anti-inflamatório do IMAO, TCP e do novo antidepressivo VORT no modelo inflamatório de depressão induzido por LPS.

Também observamos um aumento singular nos níveis de IL-4 no cérebro de animais tratados com VORT, principalmente no ST e HT. A IL-4 é uma citocina Th2 que atua como um potente regulador da resposta imune no cérebro. Estudos clássicos associaram a IL-4 com uma resposta anti-inflamatória quando secretada concomitantemente ou logo após um estímulo inflamatório (GADANI et al., 2012). A IL-4 pode regular a função dos astrócitos em direção a um fenótipo neuroprotetor, provocando a secreção de fatores de crescimento, como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento nervoso (NGF) (AWATSUJI et al., 1993; BRODIE et al., 1998). Além disso, a IL-4 pode diminuir a produção de NO e atenuar a secreção de citocinas pró-inflamatórias por essas células na estimulação com LPS. Na microglia, similarmente aos seus efeitos nos macrófagos, a IL-4 estimula sua diferenciação em direção a um fenótipo anti-inflamatório M2, marcado pela redução da produção de síntese de citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias restauradoras / proliferativas, como o IGF-1. e via PPAR γ (ORIHUELA; MCPHERSON; HARRY, 2016; ZHAO et al., 2015). Estudos anteriores mostraram que o tratamento com VORT em macrófagos isolados levou a uma mudança acentuada nas células macrofágicas de M1 (células CD86 +) para o fenótipo M2 (células CD206 +). Adicionalmente, a VORT tornou macrófagos menos sensíveis à ativação por LPS, bem como redução da secreção de TNF α e translocação de NF-KB (TALMON et al., 2018). Tomados em conjunto, sugerimos que o aparente efeito semelhante ao antidepressivo da VORT contra o comportamento tipo depressivo induzido por LPS pode ser devido à sua capacidade de ativar a resposta imune Th2 que poderia mudar o fenótipo da glia para um estado restaurador / anti-inflamatório.

Outro achado digno de nota do presente estudo foi o efeito anti-inflamatório do IMAO, TCP. Apesar das descobertas anteriores de que a fenelzina poderia potencializar a resposta

imune ao LPS (CHUNG; KIM; BAE, 2012), outras evidências sugerem um efeito da MAO na modulação da neuroinflamação através do seu efeito sobre as monoaminas, principalmente a dopamina (BERMAN; HASTINGS, 1999).

É interessante notar que nenhum dos antidepressivos testados reduziu a síntese de TNF- α no CE, nessa área, principalmente sua porção ventral, é um núcleo do sistema de recompensa do cérebro. Os neurônios dopaminérgicos apresentados nesta região comunicam-se com os neurônios da área tegmentar ventral (ATV) em resposta a estímulos associados à recompensa e à antecipação de recompensas (DANIEL; POLLMANN, 2014). A desregulação nos circuitos de recompensa do estriado e a neurotransmissão dopaminérgica estão associadas à motivação prejudicada e à anedonia na depressão (QUEVEDO et al., 2017; TAKAMURA et al., 2017). Aqui, observamos que o desafio LPS induziu uma redução no consumo de sacarose, que não foi impedida por nenhum antidepressivo. Também, aumentos induzidos por LPS no TNF- α do estriado. O melhor perfil de resposta foi associado ao VORT pela restauração do comportamento motivado / autocuidado. Curiosamente, apesar de a VORT não ter alterado significativamente os níveis de TNF- α , ela aumentou os níveis de IL-4 no estriado, o que possivelmente representa um mecanismo de proteção parcial contra o dano inflamatório induzido por LPS aos circuitos estriatais dopaminérgicos.

8.2 Papel da NOS no comportamento tipo-depressivo induzido por LPS

A administração única de LPS é um método bem estabelecido para induzir sintomas depressivos em animais, os sintomas se dão em decorrência da ativação imune (VERDONK et al., 2019). Esta ativação imune se inicia na periferia, pela ativação de células circulantes como monócitos e depois migra para o cérebro. Neste contexto, a administração de LPS em camundongos prenhes é usada para induzir um comportamento semelhante à esquizofrenia na prole, enquanto o LPS é usado em animais adultos para induzir um comportamento tipo-depressivo (RODRIGUES et al., 2018). Em nosso estudo, a administração de LPS, aumentou o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado, e reduziu a preferência por sacarose, corroborando com os dados dos estudos anteriores.

De fato, os efeitos antidepressivos dos inibidores de NOS em animais submetidos a modelos depressão induzida por stress, como o teste do nado forçado, são bem documentados (DHIR; KULKARNI, 2011). O inibidor seletivo da nNOS, o 7-nitroindazole reduziu o tempo

de imobilidade no teste do nado forçado (FERREIRA et al., 2012; VOLKE et al., 2003; ZOMKOWSKI et al., 2010). Além disso, a expressão da nNOS hipocampal é significativamente aumentada em humanos deprimidos (OLIVEIRA; GUIMARÃES; DEAKIN, 2008). Esses achados, nos levam a suscitar que a via do NO, está envolvida na patogênese da depressão, podendo ser configurada como um alvo terapêutico viável para a depressão (YILDIZ et al., 2000). Os resultados obtidos no presente estudo, com o tratamento 7-NI no teste de nado forçado e preferência por sacarose corroboram dados anteriores que mostram que a inibição da síntese de NO induz efeitos do tipo antidepressivo em roedores expostos ao teste do nado forçado ou outros modelos animais preditivos (HARKIN et al., 2003, 2004; SILVA et al., 2012; YILDIZ et al., 2000; ZHOU et al., 2007).

Nossos experimentos, demonstraram a ação antidepressiva do L-NAME no teste do nado forçado. O L-NAME, foi capaz de prevenir o aumento de imobilidade ocasionado pela administração sistêmica de LPS. Em outro estudo, que avaliava a ação do L-NAME em dose baixa e explorava o possível mecanismo de ação do L-NAME, estudando sua interação com diferentes agonistas e / ou antagonistas de diferentes receptores, moduladores do NO e com antidepressivos padrão (CHAUDHARI et al., 2010), evidenciou efeito antidepressivo similar aos identificados em nossos testes comportamentais. Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, foi possível observar que administração IP do L-NAME, preveniu o aumento de imobilidade no teste de nado forçado ocasionado pelo LPS (TOMAZ et al., 2014), fato que sugere a relação direta da nNOS no componente inflamatório da depressão. Em outro trabalho, concluiu-se que NO transforma a serotonina em uma forma inativa, afetando assim a neuromodulação, para tanto, comprovaram que o efeito modulatório da serotonina foi reduzido não apenas na presença de um doador de NO, mas também quando a sintase endógena de NO era ativada (FOSSIER et al., 1999).

O 1400 W demonstrou ser um inibidor irreversível e específico da iNOS ($K_i = 7$ nM, ou seja, 5000 e 200 vezes mais potente contra iNOS do que contra nNOS). Ao avaliarmos seu efeito no teste do nado forçado, comprovou-se efeito do tipo antidepressivo do 1400 W, o mesmo efeito, foi observado após administração repetida de 3 ou 7 dias, por outro autor, tal estudo, alerta que, a manutenção do efeito antidepressivo é um aspecto que merece destaque, uma vez que os efeitos motores dos inibidores da NOS podem sofrer tolerância com o uso repetido, o que poderia comprometer seu uso para o propósito terapêutico desejado, ou seja, como antidepressivos (DA SILVA LEAL et al., 2017).

A preferência de sacarose é um importante indicador comportamental, sendo o Teste de Preferência de Sacarose, indicado para avaliar a resposta à anedonia em roedores (STREKALOVA et al., 2006). Sendo a anedonia um sintoma-chave dos episódios de depressão humana, de acordo com os critérios do DSM-IV. A exposição ao estresse causa uma diminuição no consumo de sacarose em modelos animais de depressão (GAWALI et al., 2017; WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992), bem como a administração sistêmica de LPS (CORDEIRO et al., 2019). No presente estudo, apenas o 7-NI foi capaz de aumentar a preferência e a quantidade do consumo de sacarose em ratos submetidos a administração sistêmica do LPS, indicando uma diminuição da anedonia. Este resultado é consistente com descobertas anteriores em camundongos deprimidos com CUMS expostos à sacarose (YAZIR; UTKAN; ARICIOGLU, 2012).

O efeito antidepressivo do L-NAME, demonstrado em nossos experimentos, pode não estar relacionado a nenhum efeito motor, pois camundongos tratados L-NAME apresentaram redução da deambulação, em alguns parâmetros no teste do campo aberto (OFT), quando comparados ao grupo controle. Ao compararmos nossos dados aos de outros autores, verificamos alguns relatos de dados não significantes neste teste (ALIJANPOUR et al., 2019; FOSSIER et al., 1999; ROSTAMIAN et al., 2019).

Segundo estudos anteriores, que analisaram validade, especificidade e confiabilidade de modelos animais de depressão, concluíram que os efeitos do tipo antidepressivo, evidenciado no teste de nado forçado são dissociados de alterações na atividade locomotora (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; RÉNÉRIC; LUCKI, 1998). Ao avaliarmos a atividade locomotora do animal em vários parâmetros, observamos que o 7-NI, foi capaz de reverter o efeito do LPS descrito nesse teste (MELLO et al., 2018). No entanto, outros investigadores divergem quanto os efeitos da 7-NI na atividade locomotora em roedores. O 7-NI em doses de 120 mg / kg ip diminuiu a locomoção em ratos nesse teste (YILDIZ et al., 2000), já outros autores, afirmam que, em doses menores de 30 mg / kg i.p. reduzem a atividade locomotora em ratos (DZOLJIC; DE VRIES; VAN LEEUWEN, 1996; MAREN, 1998). O efeito sedativo evidenciado por esse teste foi relatado, após administração de em doses menores 10 mg / kg (VOLKE et al., 1997).

Em consonância com estudos anteriores (TAO et al., 2016; ZHU et al., 2016a), o presente estudo também mostrou que o LPS induziu déficits comportamentais, uma vez que, diminuiu a preferência pela sacarose e aumentou o tempo de imobilidade. Esses resultados

indicaram que o tratamento com LPS levou à anedonia e desespero em animais, comprovando sintomas característicos de depressão.

Com relação a comportamento tipo-ansiedade avaliada pela exploração do quadrante central do campo aberto, observamos que o 7-NI foi eficaz na prevenção de comportamento ansioso induzido pelo LPS. Nenhum dos outros inibidores foi capaz de apresentar efeito ansiolítico.

O efeito superior do 7-NI, ou seja, do efeito protetor da inibição da nNOS na prevenção das alterações induzidas pelo LPS merece destaque. De fato, uma possível explicação para este efeito se deve ao protocolo do estudo. No presente estudo, a administração dos inibidores da NOS foi realizada 30 min após o desafio com LPS. Neste período de 30 min alterações pró-inflamatórias sistêmicas podem ter ocorrido, mas possivelmente a nível de cérebro não houve tempo suficiente para um aumento importante na expressão da iNOS. Portanto, acreditamos que neste período de tempo a inibição da nNOS tenha sido mais importante em parar as alterações induzidas pelo LPS. Para uma melhor avaliação desta resposta resolvemos avaliar os níveis de marcadores pró- e anti-inflamatórios.

A atividade da enzima MPO foi significativamente reduzida no hipocampo dos animais submetidos ao modelo tipo-depressão induzido pelo LPS, após tratamento agudo com L-NAME e 1400w. Nas demais áreas cerebrais a MPO não se alterou após o tratamento com as drogas instituídas neste protocolo. A enzima MPO está envolvida na peroxidação lipídica e catalisa a formação de ácido hipocloroso (HOCl), a partir de cloreto e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ela é presente em neutrófilos, monócitos e células microgлияis, constituindo importante fator da Imunidade Inata (GAŁECKI et al., 2010; SPICKETT et al., 2000). Para tanto, a MPO induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, que estão envolvidas em doenças neurodegenerativas e na perda de neurogênese do hipocampo (EKDAHL et al., 2003; LEFKOWITZ; LEFKOWITZ, 2008). Níveis mais altos de MPO estão correlacionados com depressão em humanos (VACCARINO et al., 2008). Portanto, a redução da atividade da MPO no hipocampo após o tratamento agudo, sugere uma importante função neuroprotetora do L-NAME e 1400w, em estruturas cerebrais envolvidas na depressão.

Evidências crescentes demonstram que a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e outras citocinas pró-inflamatórias, desempenham um papel crucial em reações inflamatórias, bem como na gênese da depressão (SCHELLER et al., 2011). A “hipótese da citocina da depressão”, sugere que as citocinas pró-inflamatórias atuam como um

fator-chave no sistemas neuroquímico, neuroendócrino e neurotrófico do transtorno depressivo, essa hipótese é apoiada pela evidência de que a administração de citocinas pró-inflamatórias ou ativadores de citocinas exerce "comportamento de doença" e, em seguida, desenvolve "sintomas depressivos" (YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014). Nos nossos experimentos, verificamos, a elevação dos níveis de TNF- α e IL-6, nos grupos tratados com LPS, comprovando as evidências descritas anteriormente em um modelo semelhante (SARANDOL et al., 2007).

Em um modelo que abordava uma possível origem inflamatória do desespero comportamental após a indução da colite, o tratamento agudo com inibidores de NOS, dentre eles o L-NAME, diminuiu os níveis de TNF- α e o conteúdo de nitrito em amostras de hipocampo, mas não modificou a inflamação colônica (HEYDARPOUR et al., 2016). Nos nossos testes a avaliação dos níveis de TNF- α no hipocampo não foram significativos, no entanto, houve redução significativa deste marcador, no grupo tratado com L-NAME comparado ao grupo LPS, fato que relaciona o nosso modelo e o TDM a elevação de marcadores inflamatórios, como já descrito em outros estudos, que avaliaram pacientes com depressão aguda e sugeriram o TNF- α como um biomarcador na depressão (BERTHOLD-LOSLEBEN; HIMMERICH, 2008; VOGELZANGS et al., 2012), além de demonstrar a atividade anti-inflamatória do L-NAME.

Há dados de que os episódios depressivos são acompanhados por uma sensibilização aumentada das vias imunoinflamatórias e que o número de episódios depressivos está correlacionado com marcadores imunoinflamatórios, como o TNF- α e a neopterinina (MAES et al., 2012). Os nossos achados apontam para redução dos níveis de TNF- α no hipotálamo, após a administração do 7-NI, sugerindo um possível efeito imunomodulador desse inibidor da nNOS. Com o intuito de prevenir os aumentos séricos dos níveis de TNF- α em um modelo que induzia a insolação em ratos, o pré-tratamento com 7-NI, imediatamente antes do início da exposição ao calor atenuou significativamente os níveis séricos aumentados de TNF- α induzidos pelo estresse calórico (CHENG et al., 2007), ratificando os nossos dados.

Uma recente meta-análise, os níveis de IL - 4, foram medidos em pelo menos três estudos e foram, portanto, meta-analisados. Os níveis desses mediadores imunológicos não diferiram significativamente entre os indivíduos com TDM e saudáveis (KÖHLER et al., 2017). Os nossos resultados demonstram aumento significativo dos níveis desta citocina em áreas cerebrais, dos animais tratados com 1400W e 7-NI ao compararmos com os grupos Controle e LPS, no corpo estriado e hipotálamo. Com base em achados anteriores, relacionando a

regulação negativa de IL-4 com o comprometimento de um mecanismo de enfrentamento do estresse, o que pode contribuir para o desenvolvimento da vulnerabilidade a eventos adicionais relacionados ao estresse e sintomas comportamentais (HAN et al., 2015), reputamos de um possível efeito antidepressivo, no que tange as relações entre o aumento deste marcador e melhora do quadro depressivo.

As citocinas inflamatórias, incluindo IL-6, estão envolvidas na mediação da doença inflamatória (CHEN et al., 2016). Evidências indicaram o papel essencial dessa citocina inflamatória na depressão (ZHU et al., 2016b). No presente estudo, o modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por LPS foi simulado com sucesso pelo aumento da da imobilidade, acompanhada por um aumento significativo dos níveis séricos de IL-6, observamos que o L-NAME, 7-NI e 1400W, foram capazes de reverter a elevação dos níveis de IL-6.

Um estudo anterior, mostrou que a atividade da nNOS é menor nos cérebros de pacientes deprimidos (KAROLEWICZ et al., 2004), divergindo de outro trabalho, que relata aumento dos níveis de nNOS, em cérebros de ratos deprimidos (OLIVEIRA; GUIMARÃES; DEAKIN, 2008). Esses achados sugerem um papel complexo e inconsistente da nNOS cerebral na patogênese da depressão. No presente estudo, os inibidores da NOS, demonstraram efeito tipo antidepressivos em testes comportamentais, se confirmando através de avaliação de marcadores bioquímico.

9 CONCLUSÕES

No presente estudo observamos que a administração sistêmica de LPS foi capaz de induzir alterações tipo-depressivas, ou seja, desespero comportamental, anedonia e déficit motivacional. A administração de antidepressivos de diferentes classes apresentou efeitos preventivos distintos, nos quais chamamos atenção para a vortioxetina, um antidepressivo multimodal que foi capaz de prevenir todas as alterações tipo-depressão induzidas por LPS. No tocante ao possível efeito imunomodulador destes fármacos, observamos que a tranilcipromina e vortioxetina apresentaram efeito superior aos demais, visto que a vortioxetina foi a única a aumentar os níveis cerebrais de IL-4.

Na avaliação da participação da NOS na gênese do comportamento tipo-depressão induzido por LPS, observamos que a inibição da nNOS parece importante na prevenção das alterações comportamentais induzidas por LPS. Neste contexto, observamos que o 7-nitroindazol foi capaz de prevenir todas as alterações comportamentais induzidas por LPS, bem como juntamente com o 1400W foram os mais eficazes na prevenção das alterações neuroinflamatórias.

Com base na importância do LPS na fisiopatologia da depressão, estes dados obtidos ajudam a entender melhor a fisiopatologia das alterações centrais induzidas por LPS, bem como apontam para a vortioxetina e tranilcipromina como importantes estratégias antidepressivas para pacientes que apresentam o componente inflamatório da depressão.

REFERÊNCIAS

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 1, n. 357(Pt 3), p. 593–615, 2001.

ALIJANPOUR, S. et al. Co-administration of the low dose of orexin and nitrenergic antagonists induces an antidepressant-like effect in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, p. 589–594, 2019.

ALMEIDA, J. et al. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 462–74, 2015.

ALPIZAR, Y. A. et al. TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

ANDREA, L.; ANHUAMÁN, L. **Fatores comportamentais, hormonais e neuroanatômicos associados à vulnerabilidade ao estresse em ratos Carioca High Conditioned-Freezing (CHF) e Carioca Low Conditioned-Freezing (CLF) Fatores comportamentais, hormonais e neuroanatômicos associados à.** [s.l.] USP - RIBEIRÃO PRETO, 2013.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, 1973.

AWATSUJI, H. et al. Interleukin-4 and -5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes. **Journal of Neuroscience Research**, v. 34, n. 5, p. 539–45., 1993.

AYATA, C. et al. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. **Annals of Neurology**, v. 59, n. 4, p. 652–61, 2006.

BANDELOW, B. et al. **Biological markers for anxiety disorders, OCD and PTSD: A consensus statement. Part II: Neurochemistry, neurophysiology and neurocognition** **World Journal of Biological Psychiatry**, 2017.

BARSOTI, A. M. G. **Modulação dos níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em resposta ao tratamento exógeno com ACTH em.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

BATH, K. G.; MANZANO-NIEVES, G.; GOODWILL, H. Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice. **Hormones and Behavior**, v. 84, p. 64–71, 2016.

BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2011.

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

BERMAN, S. B.; HASTINGS, T. G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: Implications for Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 3, p. 1127–37., 1999.

BERRIDGE, K. C. et al. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: A model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. **BMC Biology**, v. 3, n. 4, 2005.

BERTHOLD-LOSLEBEN, M.; HIMMERICH, H. The TNF- α System: Functional Aspects in Depression, Narcolepsy and Psychopharmacology. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 3, p. 193–202, 2008.

BIELSKI, R. J.; VENTURA, D.; CHANG, C. C. A double-blind comparison of escitalopram and venlafaxine extended release in the treatment of major depressive disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 1190–6., 2004.

BLENDY, J. A. The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1144–50, 2006.

BONACCORSO, S. et al. Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. **Journal of Affective Disorders**, v. 72, n. 3, p. 237–241, 2002.

BOONEN, B. et al. Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. **Cell Calcium**, v. 73, p. 72–81, 2018.

BORTOLATO, B. et al. Cognitive remission: A novel objective for the treatment of major depression? **BMC Medicine**, v. 14, n. 9, 2016.

BOSSÙ, P. et al. A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- α and IL-18. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 101, 2012.

BOULLE, F. et al. Hippocampal and behavioral dysfunctions in a mouse model of environmental stress: Normalization by agomelatine. **Translational Psychiatry**, v. 4, n. 11, p. e485., 2014.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, 1990.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. **Nitric oxide, a novel neuronal messenger** *Neuron*, 1992.

BRODIE, C. et al. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. **Journal of Neuroimmunology**, v. 81, n. 1=2, p. 20- 30., 1998.

BROOKS, A. K. et al. Desipramine decreases expression of human and murine indoleamine-2,3-dioxygenases. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 62, p. 219–229, 2017.

BURGER, A.; YOST, W. L. Arylcycloalkylamines. I. 2-Phenylcyclopropylamine. **Journal of the American Chemical Society**, 1948.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 766–775, 2007.

CAMPBELL, M. G. et al. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 35, p. E3614-23, 2014.

CAPURON, L. et al. Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 8, p. 797- 808., 2001.

CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines and psychopathology: Lessons from interferon- α . **Biological Psychiatry**, v. 56, n. 11, p. 819–824, 2004.

CASPI, A.; MOFFITT, T. E. Gene-environment interactions in psychiatry: Joining forces with neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 583–590, 2006.

CAVAILLON, J. M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 47, n. 4, p. 000–000, 2001.

CHATKIN, J. M. Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias. **J. Pneumol.**, v. 26, n. 1, p. 36–43, 2000.

CHAUDHARI, U. P. et al. Antidepressant like effect of N(G)-Nitro-L-Arginine methyl ester. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 183–191, 2010.

CHEN, P. F.; WU, K. K. Characterization of the roles of the 594-645 region in human endothelial nitric-oxide synthase in regulating calmodulin binding and electron transfer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 17, p. 13155–63, 2000.

CHEN, T. et al. Protective Effect of Astragaloside IV Against Paraquat-Induced Lung Injury in Mice by Suppressing Rho Signaling. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 483–492, 2016.

CHENG, B. C. et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase causes attenuation of cerebrovascular dysfunction in experimental heatstroke. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 297–305, 2007.

CHOUBEY, P. et al. Ameliorative effect of fisetin against lipopolysaccharide and restraint stress-induced behavioral deficits via modulation of NF- κ B and IDO-1. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 2, p. 741–752, 2019.

CHUNG, H. S.; KIM, H.; BAE, H. Phenzelzine (monoamine oxidase inhibitor) increases production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via the NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-activated microglia cells. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 10, p. 2117–24., 2012.

CITROME, L. Vortioxetine for major depressive disorder: An indirect comparison with duloxetine, escitalopram, levomilnacipran, sertraline, venlafaxine, and vilazodone, using number needed to treat, number needed to harm, and likelihood to be helped or harmed. **Journal of Affective Disorders**, v. 196, p. 225–33, 2016.

COCHET, F.; PERI, F. The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2318, 2017.

COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS; NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.** [s.l: s.n.].

CONVERGE CONSORTIUM. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. **Nature**, v. 523, p. 588–591, 2015.

CORDEIRO, R. C. et al. Leptin Prevents Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behaviors in Mice: Involvement of Dopamine Receptors. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. 125, 2019.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–45., 2002.

CUSTÓDIO, C. S. et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 713, n. 1–3, p. 31–38, 2013.

D'AGOSTINO, A.; ENGLISH, C. D.; REY, J. A. Vortioxetine (Brintellix): A New Serotonergic Antidepressant. **PT.**, v. 40, n. 1, p. 36–40, 2015.

DA SILVA LEAL, V. M. et al. Depletion of 5 hydroxy-tryptamine (5-HT) affects the antidepressant-like effect of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in mice. **Neuroscience Letters**, v. 656, p. 131- 137., 2017.

DANIEL, R.; POLLMANN, S. A universal role of the ventral striatum in reward-based learning: Evidence from human studies. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 90–100, 2014.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, 2008.

DAWSON, V. L. et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 14, p. 6368– 6371., 1991.

DELGADO, P. L. Depression: The case for a monoamine deficiency. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, n. Suppl. 6, 2000.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 24, p. 125–131, 2011.

DINARELLO, C. A. impact of basic research on tomorrow ' s Proinflammatory Cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–8, 2000.

DOMINGUES, M. et al. Selanylimidazopyridine prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice by targeting neurotrophins and inflammatory/oxidative mediators. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, 2018.

DONG, C. et al. Effects of escitalopram, R-citalopram, and reboxetine on serum levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 144, p. 7–12, 2016.

DOWLATI, Y. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 2010.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 417–426, 2004.

DUDA, W. et al. Suppression of pro-inflammatory cytokine expression and lack of anti-depressant-like effect of fluoxetine in lipopolysaccharide-treated old female mice. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 35–42, 2017.

DUMAN, C. H. Chapter One - Models of Depression. **Vitamins & Hormones**, v. 82, p. 1–21, 2010.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597–606, 1997.

DURAIRAJ, H.; STEURY, M. D.; PARAMESWARAN, N. Paroxetine differentially modulates LPS-induced TNF α and IL-6 production in mouse macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 485–92, 2015.

DZOLJIC, M. R.; DE VRIES, R.; VAN LEEUWEN, R. Sleep and nitric oxide: Effects of 7-nitro indazole, inhibitor of brain nitric oxide synthase. **Brain Research**, v. 718, n. 1–2, p. 145–150, 1996.

EISENBERGER, N. I. et al. Inflammation-induced anhedonia: Endotoxin reduces ventral striatum responses to reward. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 8, p. 748–54, 2010.

EKDAHL, C. T. et al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 3632–7, 2003.

ELLIS, G. et al. Nitrite and nitrate analyses: A clinical biochemistry perspective. **Clinical Biochemistry**, v. 31, p. 195–220, 1998.

EPSTEIN, F. H.; MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal of Medicine**, 1993.

ERGÜN, Y.; ERGÜN, U. G. Ö. Prevention of pro-depressant effect of l-arginine in the forced swim test by NG-nitro-l-arginine and [1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]. **European Journal of Pharmacology**, v. 554, n. 2–3, p. 150–4, 2007.

FELGER, J. C.; LOTRICH, F. E. Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199–229, 2013.

FERREIRA, F. R. et al. Changes in hippocampal gene expression by 7-nitroindazole in rats submitted to forced swimming stress. **Genes, Brain and Behavior**, v. 11, n. 3, p. 303–313, 2012.

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

FOSSIER, P. et al. Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation. **Neuroscience**, v. 93, n. 2, p. 597–603, 1999.

FRENOIS, F. et al. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516–31, 2007.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 280, p. 373–376, 1980.

G. L. DA SILVA; A. S. MATTEUSSI; A. R. S. DOS SANTOS; J. B. CALIXTO; A. L.; RODRIGUES, S. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **NeuroReport**, v. 11, n. 17, p. 3699–3702, 2000.

GABILONDO, A. M.; JAVIER MEANA, J.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Increased density of μ -opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. **Brain Research**, v. 682, n. 1–2, p. 245–250, 1995.

GADANI, S. P. et al. IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4213–9., 2012.

GAŁECKI, P. et al. Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene (G-463A) in depressive patients. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 22, n. 5, p. 218–222, 2010.

GARTHWAITE, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European journal of pharmacology**, 1989.

GAVÉRIAUX-RUFF, C.; KIEFFER, B. L. Opioid receptor genes inactivated in mice: The highlights. **Neuropeptides**, v. 36, n. 2–3, p. 62–71, 2002.

GAWALI, N. B. et al. Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress-induced anxiety, depression-like behaviours and cognitive impairment by modulating nitrenergic signalling pathway. **Brain Research**, v. 1663, p. 66–77, 2017.

GHASEMI, M.; CLAUNCH, J.; NIU, K. Pathologic role of nitrenergic neurotransmission in mood disorders. **Progress in Neurobiology**, n. June, p. 1–35, 2018.

GIGLIUCCI, V. et al. A role for serotonin in the antidepressant activity of NG-Nitro-L-arginine, in the rat forced swimming test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 4, p. 524–533, 2010.

GILLMAN, P. K. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 737–748, 2007.

GONG, H. et al. Hippocampal Mrp8 / 14 signaling plays a critical role in the manifestation of depressive-like behaviors in mice. p. 1–13, 2018.

GRAY, P. et al. Myeloid Differentiation Factor-2 Interacts with Lyn Kinase and Is Tyrosine Phosphorylated Following Lipopolysaccharide-Induced Activation of the TLR4 Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 8, p. 4331–7, 2011.

GRIGOLEIT, J. S. et al. Dose-dependent effects of endotoxin on neurobehavioral functions in humans. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28330, 2011.

HACIMUSALAR, Y.; EŞEL, E. Suggested Biomarkers for Major Depressive Disorder. **Noro psikiyatri arsivi**, v. 55, n. 3, p. 280–290, 2018.

HADUCH, A. et al. The activity of brain and liver cytochrome P450 2D (CYP2D) is differently affected by antidepressants in the chronic mild stress (CMS) model of depression in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 156, p. 398–405, 2018.

HAN, A. et al. IL-4/10 prevents stress vulnerability following imipramine discontinuation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 197, 2015.

HARKIN, A. et al. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 5, p. 616–23, 2003.

HARKIN, A. et al. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 274–81, 2004.

HAROON, E.; RAISON, C. L.; MILLER, A. H. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: Translational implications of the impact of inflammation on behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 137–62, 2012.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased Levels of Glutamate in Brains from Patients with Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1310–6, 2007.

HEIBERG, I. L.; WEGENER, G.; ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1–2, p. 479–484, 2002.

HEMMATI, S. et al. The antidepressant effects of GM-CSF are mediated by the reduction of TLR4/NF-KB-induced IDO expression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 117, 2019.

HEYDARPOUR, P. et al. Behavioral despair associated with a mouse model of Crohn's disease: Role of nitric oxide pathway. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 131–41, 2016.

HIBBS, J. B. et al. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1988.

HILL, M. N. et al. Corticosterone attenuates the antidepressant-like effects elicited by melatonin in the forced swim test in both male and female rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 6, p. 905–911, 2003.

HIRSCHFELD, R. M. A. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, n. Suppl. 6, p. 4– 6., 2000.

HLAVACOVA, N. et al. Effects of vortioxetine on biomarkers associated with glutamatergic activity in an SSRI insensitive model of depression in female rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 82, p. 332–338, 2018.

HOLSBOER, F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 477–501, 2000.

HYDE, C. L. et al. Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. **Nature Genetics**, v. 48, n. 9, p. 1031–6, 2016.

IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 1989.

JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology**, v. 185, n. 3, p. 298–305, 2006.

JOËLS, M. et al. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 1, p. 1–7, 2008.

JURUENA, M. F. et al. The development and application of the prednisolone suppression test in psychiatry: a novel tool for assessing glucocorticoid and mineralocorticoid receptor function. **The Journal of Psychiatry**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2010.

KAREGE, F. et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Research**, v. 109, n. 2, p. 143–8, 2002.

KAROLEWICZ, B. et al. Low nNOS protein in the locus coeruleus in major depression. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 5, p. 1057–1066, 2004.

KEASLING, A. W. et al. Salvindolin elicits opioid system-mediated antinociceptive and antidepressant-like activities. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 7, p. 865–881, 2019.

KELLY, J. P.; WRYNN, A. S.; LEONARD, B. E. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 74, n. 3, p. 299–316, 1997.

KIM, Y. K. et al. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 5, p. 1044–1053, 2007.

KIM, Y. K.; MAES, M. The role of the cytokine network in psychological stress. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 15, n. 3, p. 148–155, 2003.

KLEIN, G.; RAINA, S. Regulated Assembly of LPS, Its Structural Alterations and Cellular Response to LPS Defects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 356, 2019.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemical Journal**, v. 298, n. Pt 2, p. 249–58, 1994.

KÖHLER, C. A. et al. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 135, n. 5, p. 373–387, 2017.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 154–9., 2002.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008.

KRYSTAL, J. H. et al. Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. suppl 1, p. S71–S80, 2002.

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

KULESZA, M.; RAGURAM, R.; RAO, D. Perceived mental health related stigma, gender, and depressive symptom severity in a psychiatric facility in South India. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 9, p. 73–77, 2014.

KUMAR, A. et al. Venlafaxine involves nitric oxide modulatory mechanism in experimental model of chronic behavior despair in mice. **Brain Research**, v. 1311, p. 73–80, 2010.

LAKHAN, S. E.; VIEIRA, K.; HAMLAT, E. Biomarkers in psychiatry: Drawbacks and potential for misuse. **International Archives of Medicine**, v. 3, n. 1, 2010.

LAPIDUS, K. A.; SOLEIMANI, L.; MURROUGH, J. W. Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 9, p. 1101– 12., 2013.

LEFKOWITZ, D. L.; LEFKOWITZ, S. S. Microglia and myeloperoxidase: A deadly partnership in neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 726–31, 2008.

LEMBKE, A. et al. The mineralocorticoid receptor agonist, fludrocortisone, differentially inhibits pituitary-adrenal activity in humans with psychotic major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 1, p. 115–21, 2013.

LIAN, T.; AN, S.-C. Antidepressant effect of microinjection of neuropeptide Y into the hippocampus is mediated by decreased expression of nitric oxide synthase. **Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]**, v. 62, n. 3, p. 237–46, 2010.

LLORCA, P.-M. et al. Relative efficacy and tolerability of vortioxetine versus selected antidepressants by indirect comparisons of similar clinical studies. **Current Medical Research and Opinion**, v. 30, n. 12, p. 2589–606, 2014.

LOPES, I. S. et al. Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 33–42, 2018.

LU, Y. et al. Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0186700., 2017.

LÜSCHER, B.; MÖHLER, H. Brexanolone, a neurosteroid antidepressant, vindicates the GABAergic deficit hypothesis of depression and may foster resilience. **Faculty Rev**, v. 8, 2019.

MACIEL, A. L. et al. Acute treatment with ketamine and chronic treatment with minocycline exert antidepressant-like effects and antioxidant properties in rats subjected different stressful events. **Brain Research Bulletin**, v. 137, p. 204–216, 2018.

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

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 endocrinology letters**, v. 35, n. 3692, p. 676–692, 2008.

MAES, M. An intriguing and hitherto unexplained co-occurrence: Depression and CFS are manifestations of shared inflammatory, oxidative and nitrosative (IO & NS) pathways. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 784–794, 2011a.

MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 664–75, 2011b.

MAES, M. et al. Activation of cell-mediated immunity in depression: Association with inflammation, melancholia, clinical staging and the fatigue and somatic symptom cluster of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 169–75., 2012.

MAGDY, A. et al. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC): Does it have a role in colorectal tumorigenesis? A Prospective Cohort Study. **International Journal of Surgery**, v. 18, p. 169–173, 2015.

MALHI, G.; MANN, J. Depression. **Lancet**, v. 392, n. 10161, p. 2299- 2312., 2018.

MAREN, S. Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. **Brain Research**, v. 804, n. 1, p. 155–158, 1998.

MARTIS, L.-S. et al. Resilient and depressive-like rats show distinct cognitive impairments in the touchscreen paired-associates learning (PAL) task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 155, p. 287–296, 2018.

MCBRAYER, M. C. P. J. W. Treatment of affective depression with trans-dl-phenylcyclopropylamine hydrochloride; a preliminary report. **Am. J. Psychiatry**, v. 116, p. 67–68, 1959.

MCGONAGLE, K. A.; KESSLER, R. C. Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. **American journal of community psychology**, v. 18, n. 5, p. 681–706, 1990.

MELLO, B. S. F. et al. Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 320, p. 133–142, 2018.

MENDONÇA, M. T. et al. Effects of gonadal sex steroids on sexual behavior in the big brown bat, *Eptesicus fuscus*, upon arousal from hibernation. **Hormones and Behavior**, v. 30, n. 2, p. 153–61, 1996.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, p. 732–741, 2009.

MILLETT, C. E.; PHILLIPS, B. E.; SAUNDERS, E. F. H. The Sex-specific Effects of LPS on Depressive-like Behavior and Oxidative Stress in the Hippocampus of the Mouse. **Neuroscience**, v. 399, p. 77–88, 2019.

MOLENDIJK, M. L. et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: Evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 791–800, 2014.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **pharmacological reviews**, 1991.

MONLEON, S. et al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. **Psychopharmacology**, v. 117, n. 4, p. 453–457, 1995.

MONTGOMERY, S. A.; HUUSOM, A. K. T.; BOTHMER, J. A randomised study comparing escitalopram with venlafaxine XR in primary care patients with major depressive disorder. **Neuropsychobiology**, v. 50, n. 1, p. 57–64, 2004.

MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331–340, 2012.

MULLINS, N.; LEWIS, C. M. Genetics of Depression: Progress at Last. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, n. 8, p. 43, 2017.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–52, 2002.
NAZIMEK, K. et al. The role of macrophages in anti-inflammatory activity of antidepressant drugs. **Immunobiology**, v. 222, n. 6, p. 823- 830., 2017.

NEIS, V. B. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α is abolished by agmatine administration. **Behavioural Brain Research**, v. 261, p. 336–44, 2014.

NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503–528, 2002.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, 2010.

NIE, Y. et al. **High-speed video analysis of laboratory rats behaviors in forced swim test.** Arlington, VA, USA: 2008 IEEE International Conference on Automation Science and Engineering, 2008

NOLLET, M.; LE GUIQUET, A.-M.; BELZUNG, C. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. **Current protocols in pharmacology**, v. Chapter 5, p. Unit 5.65, jun. 2013.

OHGI, Y. et al. Effects of antidepressants on alterations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Biological Psychiatry**, v. 103, n. 4, p. 853–859, 2013.

OLIVEIRA, R. M. W.; GUIMARÃES, F. S.; DEAKIN, J. F. W. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 333–341, 2008.

ORIHUELA, R.; MCPHERSON, C. A.; HARRY, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 4, p. 649–6, 2016.

OWENS, M. J.; KNIGHT, D. L.; NEMEROFF, C. B. Second-generation SSRIs: Human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 5, p. 345–50., 2001.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–6., 1987.

PATIL, C. S.; SINGH, V. P.; KULKARNI, S. K. Peripheral and central activation of nitric oxide-cyclic GMP pathway by sildenafil. **Inflammopharmacology**, v. 13, n. 5–6, p. 467–78, 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2. ed. New York: Academic Press, 1986.

PERLIS, R. H. et al. Clinical and Genetic Dissection of Anger Expression and CREB1 Polymorphisms in Major Depressive Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 536–40, 2007.

PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: Implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 18, n. 5, p. 407–413, 2004.

PETRIE, R. X. A.; REID, I. C.; STEWART, C. A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder: A critical review. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 87, n. 1, p. 11–25, 2000.

PETTY, F.; SHERMAN, A. D. GABAergic modulation of learned helplessness. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 4, p. 567–70, 1981.

PICCHINI, A. M.; MANJI, H. K.; GOULD, T. D. GSK-3 and neurotrophic signaling: Novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 4, p. 419–428, 2004.

PITOSI, F. et al. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 48, n. 4, p. 287–298, 1997.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 200–207, 2015.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 1978.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 51–68, 2001.

QUEVEDO, K. et al. Ventral Striatum Functional Connectivity during Rewards and Losses and Symptomatology in Depressed Patients. **Biological Psychology**, v. 123, p. 62–73, 2017.

RACAGNI, G.; POPOLI, M. The pharmacological properties of antidepressants. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 117–131, 2010.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635–700, 2002.

REED, A. L. et al. Juvenile rats in the forced-swim test model the human response to antidepressant treatment for pediatric depression. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 3, p. 433–441, 2008.

RÉNÉRIC, J. P.; LUCKI, I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 190–197, 1998.

RITTBERG, B. R. Major depressive disorder. **The Medical Basis of Psychiatry: Fourth Edition**, v. 2, n. Mdd, p. 79–90, 2016.

RODRIGUES, F. T. S. et al. Major depression model induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration: Long-lasting behavioral, neuroimmune and neuroprogressive alterations. **Journal of Psychiatric Research**, v. 107, p. 57–67, 2018.

ROSSETTI, A. C. et al. Genome-wide analysis of LPS-induced inflammatory response in the rat ventral hippocampus: Modulatory activity of the antidepressant agomelatine. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 19, n. 5, p. 390–401., 2018.

ROSTAMIAN, A. et al. Involvement of the nitric oxide pathway in the anti-depressant-like effects of thalidomide in mice. **Physiology and Behavior**, v. 208, n. March, p. 112572, 2019.

RUCKDESCHEL, K. et al. Signaling of Apoptosis through TLRs Critically Involves Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Inducing IFN- β , but Not MyD88, in Bacteria-Infected Murine Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3320–3328, 2004.

SALAZAR, A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 202–209, 2012.

SALGO, M. G. et al. DNA Damage and Oxidation of Thiols Peroxynitrite Causes in Rat Thymocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 500–5, 1995.

SARANDOL, A. et al. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: Short-term antidepressant treatment does not alter oxidative - Antioxidative systems. **Human Psychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 67–73, 2007.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American journal of psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–522, 1965.

SELIGMAN, M. E. P. **Helplessness: On depression, development, and death**. [s.l: s.n.].

SEO, M. K.; LEE, J. G.; PARK, S. W. Effects of escitalopram and ibuprofen on a depression-like phenotype induced by chronic stress in rats. **Neuroscience Letters**, v. 696, p. 168–173, 2019.

SHEN, Y. et al. Differential effect of chronic antidepressant treatments on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat. **Life Sciences**, v. 65, n. 17, p. 1773–86., 1999.

SHISHKINA, G. T. et al. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression. **Behavioural Brain Research**, v. 213, n. 2, p. 218–24, 2010.

SILVA, M. et al. Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 3, p. 443–453, 2012.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Medical Hypotheses**, v. 35, n. 4, p. 298–306, 1991.

SOUSA, C. N. S. DE et al. Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. **Psychiatry Research**, v. 230, n. 2, p. 211–9, 2015.

SPICKETT, C. M. et al. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 4, p. 889–899, 2000.

SPRENGER, T.; VIANA, M.; TASSORELLI, C. Current prophylactic medications for migraine and their potential mechanisms of action. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 2, p. 313–323, 2018.

STREKALOVA, T. et al. Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. **Behavioural Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 271–287, 2006.

SUAREZ, E. C. et al. Enhanced expression of cytokines and chemokines by blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide stimulation are associated with hostility and severity of depressive symptoms in healthy women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 65, n. 3, p. 362–368, 2004.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 10, p. 1552–62, 2000.

SURÍS, A. et al. Effects of exogenous glucocorticoid on combat-related PTSD symptoms. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 274–279, 2010.

TAKAMURA, M. et al. Patients with major depressive disorder exhibit reduced reward size coding in the striatum. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 79, n. Pt B, p. 317–323, 2017.

TALMON, M. et al. Vortioxetine exerts anti-inflammatory and immunomodulatory effects on human monocytes/macrophages. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 1, p. 113–124, 2018.

TAO, W. et al. Paeonol attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Psychiatry Research**, v. 238, p. 116–121, 2016.

TOMAZ, V. S. et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 261, p. 236–46, 2014.

TORREGROSSA, M. M. et al. Chronic administration of the delta opioid receptor agonist (+)BW373U86 and antidepressants on behavior in the forced swim test and BDNF mRNA expression in rats. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 1, p. 31–40, 2005.

TYNAN, R. J. et al. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 3, p. 469–79., 2012.

UHER, R.; MCGUFFIN, P. The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the etiology of depression: 2009 update. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 18–22, 2010.

VACCARINO, V. et al. Association of Major Depressive Disorder with Serum Myeloperoxidase and Other Markers of Inflammation: A Twin Study. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 476–483, 2008.

VERDONK, F. et al. Microglial production of quinolinic acid as a target and a marker of the antidepressant effect of ketamine. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. S0889-1591, n. 19, p. 30438–6., 2019.

VIALOU, V. et al. Epigenetic Mechanisms of Depression and Antidepressant Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, n. 53, p. 59–87, 2013.

VOGELZANGS, N. et al. Association of depressive disorders, depression characteristics and antidepressant medication with inflammation. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 2, p. e79, 2012.

VOGELZANGS, N. et al. Cytokine production capacity in depression and anxiety. **Translational psychiatry**, v. 6, n. 5, p. e825., 2016.

VOLKE, V. et al. 7-nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 131, n. 4, p. 399–405, 1997.

VOLKE, V. et al. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 140, n. 1–2, p. 141–7., 2003.

WARDEN, D. et al. **The STAR*D project results: A comprehensive review of findings** *Current Psychiatry Reports*, 2007.

WIBORG, O. **Chronic mild stress for modeling anhedonia** *Cell and Tissue Research*, 2013.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 4, p. 525–534, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, 2017.

WRIGHT, C. E. et al. Acute inflammation and negative mood: Mediation by cytokine activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 4, p. 345–50., 2005.

YAN, H. C. et al. Behavioral animal models of depression. **Neuroscience Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 327–337, 2010.

YANIV, S. P. et al. Dexamethasone enhances the norepinephrine-induced ERK/MAPK intracellular pathway possibly via dysregulation of the α 2-adrenergic receptor: Implications for antidepressant drug mechanism of action. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 9, p. 712–722, 2010.

YAZIR, Y.; UTKAN, T.; ARICIOGLU, F. Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase and Soluble Guanylate Cyclase Prevents Depression-Like Behaviour in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 111, n. 3, p. 154–160, 2012.

YILDIZ, F. et al. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 41–44, 2000.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research**, v. 711, n. 1–2, p. 163–74, 1996.

YIRMIYA, R. et al. Illness, cytokines, and depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2000.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2011.

YOUNG, J. J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 20, n. 9, p. 15–20, 2014.

ZHANG, C. et al. Influence of BCL2 gene in major depression susceptibility and antidepressant treatment outcome. **Journal of Affective Disorders**, v. 155, p. 288–294, 2014.

ZHANG, H. et al. Brain gray matter alterations in first episodes of depression: A meta-analysis of whole-brain studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 60, p. 43–50, 2016.

ZHAO, X. et al. Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 11281–91, 2015.

ZHOU, Q. G. et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1843–54, 2007.

ZHU, C. BIN et al. Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 13, p. 2510–20, 2010.

ZHU, L. et al. Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. **Physiology and Behavior**, v. 163, p. 184–192, 2016a.

ZHU, L. et al. Salidroside ameliorates arthritis-induced brain cognition deficits by regulating Rho/ROCK/NF- κ B pathway. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 134–142, 2016b.

ZOMKOWSKI, A. D. E. et al. Involvement of NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 11, p. 793–801, 2010.

ZUBENKO, G. S. et al. Genetic linkage of region containing the CREB1 gene to depressive disorders in women from families with Recurrent, Early-Onset, Major Depression. **American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics**, v. 114, n. 8, p. 980–7, 2002.

**APÊNDICE – Paper Submetido a
Revista Científica Qualis A1**

Outlook Pesquisar

Caixa de Entr... 929

Lixo Eletrônico 73

Rascunhos 124

Itens Enviados 1

Itens Excluídos 112

Arquivo Morto

ARQUIVADOS 1

AULAS DE ÉTICA

AULAS DE HISTO

Atualizar para o Office 365 com Recursos premium do Outlook

Track your co-authored submission to Brain Behavior and Immunity

Brain Behavior and Immunity <Evisesupport@elsevier.com>

Seg, 22/07/2019 13:56

Você

Dear Dr Tomaz,

Submission no: BBI_2019_672

Submission title: Neuroimmune effects of different classes of antidepressants in a rat model of inflammation-induced depression

Corresponding author: Professor Danielle Macedo

Listed co-author(s): Dr Adriano Chaves, Miss Michele Soares, Dr Antonio Teixeira, Dr wei jiang, Dr Viviane Tomaz, Miss Paloma Jucá, Dr Poliana Barroso, Ms Rafaela Cordeiro, Dr david De Lucena, Dr Larissa Cristino

Professor Macedo has submitted a manuscript to Brain Behavior and Immunity and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evisesupport.com/profile/api/navigate/BBI?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach08891591%23%2FBBI%2Fsubmission%2FBBI_2019